

# THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

**Claude GÉRARDIN**

PHARMACIEN

Ex-Moniteur de Chimie

Diplômé d'Études Supérieures de Chimie Biologique

Né le 7 Mars 1933 à FOUG (Meurthe-et-Moselle)

---

**Sur la résistance au mercure d'une levure**

**(Candida utilis)**

**Obtention d'une souche résistante, ses caractères**

---

*Soutenue le 20 Décembre 1958 devant la Commission d'Examen*

---

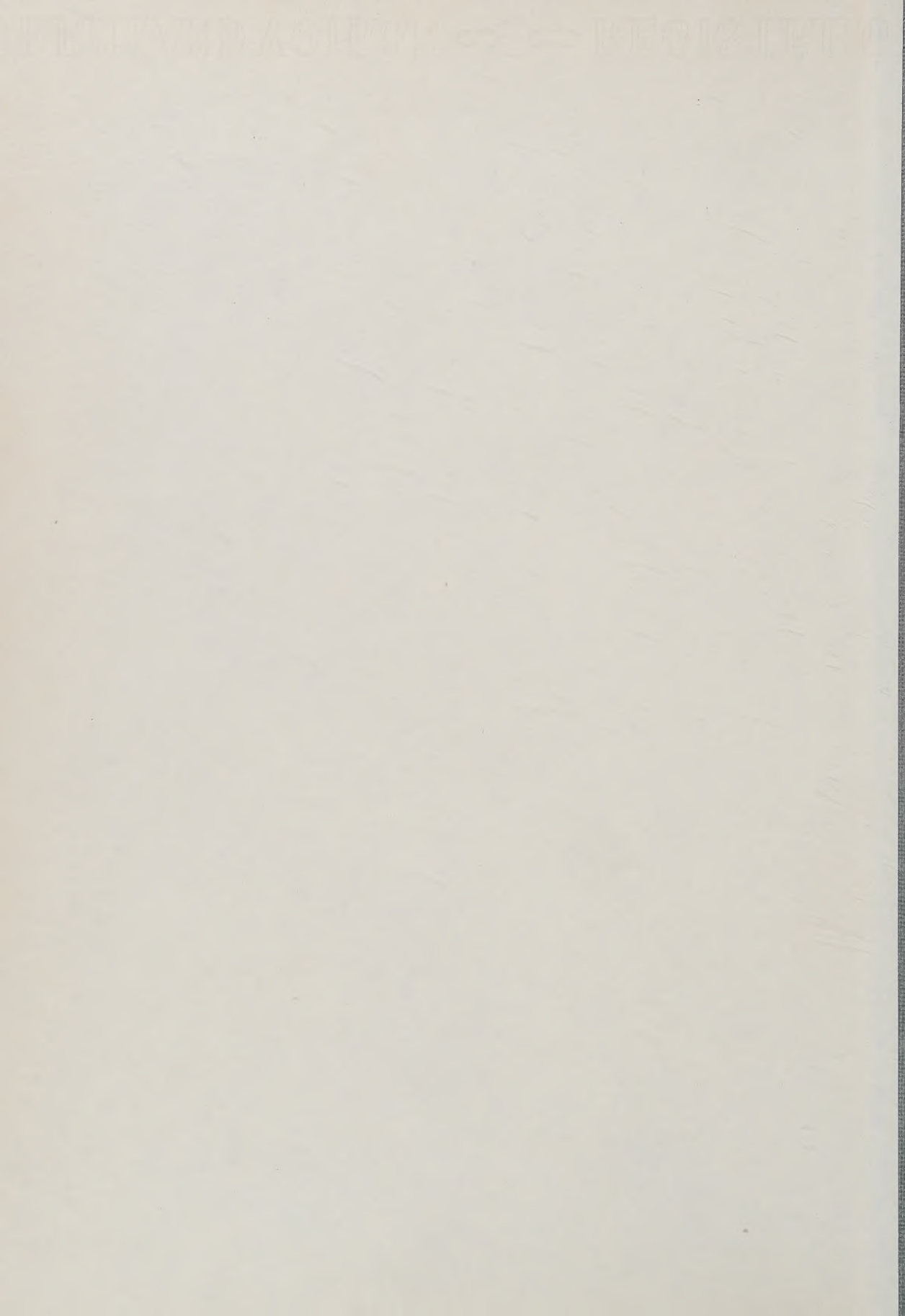
*Président.* . . . . .

M. le Doyen KAYSER

*Juges* . . . . . }

M. le Professeur FRANQUET

Mlle BESSON, Maître de Conférences



Nancy, 1912.

20 Mars 1912

# THÈSE

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE NANCY

Par M. le Docteur en Médecine et en Pharmacie

M. GÉRARD

CAUSE GÉRARD

Pharmacien à Nancy

Le 20 Mars 1912

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Présentée

Sur la résorption au mercure d'une leucine

(Cas de leucémie)

Obtention d'une sonde résistante aux rayons X

Par M. le Docteur en Médecine et en Pharmacie

Présenté

M. le Docteur en Médecine et en Pharmacie

M. le Docteur en Médecine et en Pharmacie

M. le Docteur en Médecine et en Pharmacie

Pierre OUDART

Relieur

11, Rue Sainte-Anne

NANCY



# THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

**Claude GÉRARDIN**

PHARMACIEN

Ex-Moniteur de Chimie

Diplômé d'Études Supérieures de Chimie Biologique



Né le 7 Mars 1933 à FOUG (Meurthe-et-Moselle)

**Sur la résistance au mercure d'une levure**

**(Candida utilis)**

**Obtention d'une souche résistante, ses caractères**

*Soutenue le 20 Décembre 1958 devant la Commission d'Examen*

Président. . . . .

M. le Doyen KAYSER

Juges . . . . . }

M. le Professeur FRANQUET

Mlle BESSON, Maître de Conférences

# THÈSE

À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

M. le Docteur "PHARMACIE"

Claude GÉRARD

Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Sur la résistance au traitement d'une leucémie

(Compte rendu)

Obtention d'une souche résistante, ses caractéristiques

Thèse n° 20. Déposée le 15 mai 1926 devant la Commission d'Examen

M. le Docteur KAYSER

M. le Docteur FRANÇOIS

M. le Docteur JACOB

Président

Vice

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN : F. KAYSER  
ASSESEUR : A. MEUNIER  
SECRETAIRE : P. RADUREAU

Personnel Enseignant

Professeurs

|      |                 |                     |
|------|-----------------|---------------------|
| M.   | MEUNIER A.      | Pharmacie galénique |
| Mlle | FRANCOIS H. Th. | Matière Médicale    |
| MM.  | KAYSER F.       | Chimie              |
|      | FRANQUET R.     | Botanique           |
|      | MARCHAL J.G.    | Microbiologie       |
|      | STEIMETZ E.     | Sciences naturelles |
|      | BLOCH J.M.      | Toxicologie         |
|      | SOLEIL J.       | Pharmacie chimique  |
|      | BERNANOSE A.    | Physique            |

MATRES DE CONFERENCES AGREGES

|      |           |                 |
|------|-----------|-----------------|
| Mlle | BESSON S. | Pharmacodynamie |
| M.   | BENE R.   | Microbiologie   |

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

|      |                                              |                                                       |
|------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| M.   | MEUNIER A.                                   | Hydrologie                                            |
| Mlle | FRANCOIS H.Th.                               | Hygiène                                               |
| MM.  | KAYSER F.                                    | Biochimie technique                                   |
|      | FRANQUET R.                                  | Cryptogamie                                           |
|      | MARCHAL J.G.                                 | Parasitologie                                         |
|      | STEIMETZ E.                                  | Mycologie-Minéralogie                                 |
|      | BLOCH J.M.                                   | Chimie minérale                                       |
|      | SOLEIL J.                                    | Chimie organique                                      |
|      | BERNANOSE A.                                 | Optique et Acoustique                                 |
|      | ROBLOT R. (Professeur à la Faculté de Droit) | Déontologie                                           |
| Mlle | BESSON S.                                    | Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses. |
| MM.  | BENE R.                                      | Bactériologie                                         |
|      | ANZIANI P.                                   | Caractères analytiques des sels                       |
| Mme  | LASSEUR A.                                   | Techniques spéciales d'analyses bactériologiques.     |
| MM.  | MIRJOLET M.                                  | Chimie analytique                                     |
|      | PIERFITTE M.                                 | C.E.S. Chimie biologique                              |



## CHEFS DE TRAVAUX

|      |                             |                                           |
|------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| M.   | ANZIANI P.                  | Chimie                                    |
| Mme. | LASSEUR A.                  | Microbiologie-Parasitologie               |
| MM.  | MIRJOLET M.                 | Sciences pharmaceutiques                  |
|      | N'                          | Bactériologie et Parasitologie techniques |
|      | PIERFITTE M. (délégué)      | Chimie biologique                         |
|      | VILLOUTREIX J. (délégué)    | Micrographie                              |
|      | PELT J.M. (délégué)         | Chimie                                    |
|      | BURTE J.M. (chargé de T.P.) | Physique                                  |

Doyen honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier  
Professeur honoraire : M. CORDEBARD.

\*

\*

\*

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les inapprouver.



A mes Parents

Témoignage d'affection et de reconnaissance



A mon Maître et Président de Thèse  
Monsieur le Professeur KAYSER  
Doyen de la Faculté de Pharmacie

A mes juges

Monsieur le Professeur FRANQUET  
Professeur de Botanique

Mademoiselle BESSON  
Maître de Conférences de Pharmacodynamie

A tous mes Maîtres

de la Faculté de Pharmacie de Nancy

HOMMAGE RESPECTUEUX ET RECONNAISSANT



## - A V A N T - P R O P O S - ---

Avant d'exposer le résultat de ce travail, il m'est particulièrement agréable de remercier ceux qui m'ont permis d'élaborer et de soutenir cette thèse.

Désireux d'approfondir mes connaissances en chimie biologique, j'eus la chance, au cours de ma scolarité, d'être accueilli par Monsieur le Doyen KAYSER, dans son laboratoire en tant que moniteur. Mon diplôme de Pharmacien obtenu, je fus mis en rapport par Monsieur le Doyen KAYSER avec Monsieur le Professeur PAUL, directeur scientifique des usines RHONE-POULENC, qui voulut bien me faire entrer dans cette firme. Je fus ainsi dégagé de tout souci d'ordre pécuniaire et je pus consacrer mon temps au laboratoire.

Que Monsieur le Professeur PAUL et la société RHONE-POULENC soient assurés de ma vive et profonde reconnaissance.

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur le Doyen KAYSER qui a inspiré et dirigé mon travail, grâce à sa haute compétence scientifique et à ses conseils judicieux, je pus mener ma Thèse à son terme.

Ma gratitude va également à Monsieur le Professeur FRANQUET qui a bien voulu accepter d'être juge de notre Thèse.

Mademoiselle BESSON, Maître de conférences, m'a toujours réservé dans son laboratoire un accueil des plus cordiaux et des plus fructueux, dont je lui garde une sincère reconnaissance.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur BLOCH pour les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de notre travail, ainsi que Monsieur MIRJOLET, Chef de travaux, pour l'intérêt qu'il m'a manifesté.

Enfin je n'aurai garde d'oublier Messieurs PIERFITTE et VILLOUTREIX ainsi que tous mes camarades de laboratoire.



Lors de notre entrée dans le laboratoire de Monsieur le Doyen KAYSER, les recherches sur les sulfamides, qui avaient d'abord porté sur l'action antibiotique de ces derniers en association avec divers médicaments, étaient alors orientées sur les modifications biochimiques que la résistance à ces agents toxiques entraîne chez les germes (M. PIERFITTE) (49).

Si les mécanismes d'acquisition de la résistance aux antibiotiques ont été et sont toujours largement étudiés, il semble que ceux de la résistance aux agents chimiques et plus particulièrement ceux relatifs aux métaux lourds, n'aient pas connu pareil essor de travaux scientifiques. C'est pour ces raisons que nous avons essayé de développer la résistance d'une levure à un métal et d'étudier ultérieurement le mécanisme de cette résistance.

Notre Maître de Thèse avait déjà travaillé sur le mercure en mettant au point une méthode de dosage toxicologique ; de plus le mercure possède une action bactéricide extrêmement marquée à très faible dose ; il a enfin l'avantage, à l'inverse de l'argent ou de l'or par exemple, de ne pas précipiter avec les milieux de culture employés ; c'est pourquoi nous l'avons choisi.

La toxicité vis à vis des germes est principalement due à l'ion mercurique. Nous nous sommes adressés au chlorure mercurique, dont l'action bactéricide parmi les sels mercuriques est la plus forte, en effet, il est le plus dissocié en solution aqueuse (62) ; à concentration moléculaire égale, il est plus toxique que le bromure ou le cyanure (5) ; bien que moins dissocié que le nitrate ou le sulfate, il est cependant plus actif à pourcentage de mercure égal, peut être à cause de sa liposolubilité.

Le chlorure mercurique est surtout bactériostatique, son effet est sensible à des dilutions de l'ordre du millionième sur la plupart des germes ; il requiert pour être germicide des concentrations beaucoup plus considérables (33).



C'est ainsi que son action toxique vis à vis de différents germes est la suivante d'après ZUIZ (62) : il provoque un arrêt de la croissance du bacille du choléra à la concentration de  $1/100.000$ , du bacille typhique à  $1/20.000$  et du staphylocoque comme du streptocoque à  $1/4.000$ . Le bacille diphtérique est tué en 24 heures par une concentration de  $1/1.000.000$ , en 22 minutes par  $1/10.000$  et en 2 minutes et demi par  $1/3.000$ . D'après COOK (20), le mercure se trouve parmi les éléments les plus toxiques et entraîne une inhibition complète de la croissance des levures à une concentration comprise entre  $1/1.000.000$  et  $1/100.000$ . Son absence des cellules de levures croissant sur milieu exempt de mercure a été démontrée par des analyses spectrographiques.

Dans ce travail, nous avons donc essayé d'augmenter la résistance d'une levure au chlorure mercurique, et ensuite par des dosages systématiques du mercure, nous avons cherché à mettre en évidence les différences de comportement entre la souche résistante obtenue et la souche normale. Enfin nous avons déterminé la teneur en groupements -SH des deux souches, pour voir si elles présentent des différences susceptibles de rendre compte de la résistance (28) (50).

\*

\*      \*



## - CHÂPITRE I -

### OBTECTION D'UNE SOUCHE DE CANDIDA UTILIS

#### RESISTANTE AU CHLORURE MERCURIQUE.

#### A) - NOTIONS GENERALES SUR L'ACQUISITION DE LA RESISTANCE : ADAPTATION ET MUTATION.

Les métaux lourds, le mercure en particulier, sont susceptibles de se fixer sur les microorganismes ; ce fait est depuis longtemps reconnu et même parfois utilisé en thérapeutique (levures métallisées) ; par contre, la possibilité pour un microorganisme, de vivre et de se multiplier en présence de concentrations d'un toxique minéral qui seraient léthales pour un microorganisme parent, est un phénomène de nature différente qui peut parfois être mis en évidence ; bien que décelé et étudié depuis un demi-siècle son mécanisme n'est pas encore élucidé de façon vraiment satisfaisante. Il se rattache à la notion plus générale du développement de la résistance aux drogues chez les microorganismes, dont l'étude a montré les caractères fondamentaux suivantes :

- La résistance ne peut pas toujours s'obtenir, en général, elle s'acquiert graduellement mais elle peut aussi être maximum d'emblée, elle peut se conserver plus ou moins longtemps par subcultures en l'absence de la drogue toxique, elle peut présenter une spécificité très variable et elle peut même être induite par une molécule différente de la molécule toxique, enfin elle peut parfois être induite par introduction dans les milieux de culture d'acides désoxyribonucléiques extraits de microorganismes résistants.

D'assez nombreuses études se rencontrent dans la littérature scientifique qui traitent de l'acquisition par les levures d'un certain degré de résistance vis à vis de la plupart des métaux (45). Nous empruntons à COOK (20) les exemples suivants.



C'est ainsi qu'en 1954 PERLMAN et O'BRIEN parviennent à entraîner *Saccharomyces cerevisiae* à croître normalement en présence de 0,75 g pour 1.000 de nitrate de cobalt alors que la souche normale pousse mal en présence de 0,10 g pour 1.000 ; HARTELIUS en 1956 note que la tolérance au chrome présentée par une levure peut être quadruplée par subcultures en présence de sels de chrome. Les travaux des chercheurs ont porté principalement sur la résistance au cuivre : Mc HARGUE parvient à obtenir une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dont la résistance au cuivre est 7 fois supérieure à celle de la souche mère ; MINAGAWA montre que non seulement une levure peut tolérer des concentrations relativement élevées de cuivre mais que des extraits de souches résistantes introduits dans les milieux de culture sont capables de conférer la résistance aux levures normales ; NAIKI, MINAGAWA et coll (47) avaient précédemment prouvé que les cellules résistantes au cuivre accumulent une quantité de ce métal plus grande que celle fixée par les cellules sensibles.

Les travaux que nous avons relevés relatifs à la résistance des germes au mercure sont peu nombreux.

ZAMBONELLI (61) entraîne *Saccharomyces cerevisiae* à croître en présence de 10  $\mu$ g de nitrate de phénylmercure par ml de milieu de culture, alors que la souche mère croît normalement en présence de 0,1  $\mu$ g par ml. TISHENESKI et PEROVA (37) (38) ont réussi à adapter *Saccharomyces cerevisiae* à proliférer normalement sur des milieux contenant 10 fois plus de chlorure mercurique que la concentration initiale supportée par la levure, après 400 passages consécutifs sur des milieux dont le taux de chlorure mercurique augmente peu à peu.

En raison de la lenteur et de la régularité dans l'accroissement de la résistance au toxique, ces auteurs pensent que la levure s'adapte progressivement, c'est pourquoi écrivent-ils, si une série de généticiens affirme que le processus d'adaptation a lieu seulement par une sélection de formes résistantes qui prennent naissance spontanément dans les cultures,



c'est négliger le rôle du milieu extérieur dans l'apparition de nouvelles variations. Il est difficile d'admettre dans une population bactérienne, la possibilité de l'existence antérieure de cellules résistantes à n'importe quelle molécule, étant donné que l'adaptation peut être réalisée pour les différents facteurs chimiques. En conséquence, les conditions extérieures, non seulement sélectionnent mais produisent la formation de formes résistantes. Au contraire SELIBER et KATZNELSON (54) réussissent à obtenir une levure résistante au toxique par passage direct sur milieu contenant une concentration élevée de chlorure mercurique, puis repiquages successifs sur ce même milieu des cultures qui s'étaient développées le plus facilement ; de même BRIAULT (11) sélectionne des souches d'*Aspergillus glaucus* dont les spores et les hyphes survivent sur milieu relativement concentré en chlorure mercurique.

On retrouve donc dans le cas qui nous occupe : obtention de levure ayant une résistance accrue à l'ion mercurique, les deux grandes théories explicatives (mutation et adaptation) qui s'affrontent, parfois en se complétant, pour rendre compte de l'adaptation microbienne aux variations de milieu : déplacement sélectif de l'équilibre qui règne entre les différents types coexistant dans une population et réorganisation, sous l'influence du poison, de l'économie interne, de l'équipement enzymatique des différents microorganismes en expérience.

La théorie mutationniste attribue l'apparition de cultures résistantes à la nature hétérogène de la population bactérienne. Parmi le grand nombre de cellules formant une culture, quelques unes se trouvent être plus résistantes que d'autres à la drogue. Introduites sur un milieu contenant la drogue, les cellules les plus résistantes sont en meilleure position pour croître ; c'est pourquoi elles sont sélectionnées automatiquement et chacune d'elles devient le point de départ d'une race résistante. Après un nombre variable de passages sur milieu contenant la drogue, spécialement si on augmente progressivement la concentration de cette dernière, on obtient des cultures dont la résistance est accrue. Les cellules spontanément résistantes



présentent ce caractère comme étant stable et héréditaire. C'est pourquoi elles sont fréquemment considérées comme des cellules mutantes.

Quelquefois la résistance maximum envers la drogue apparaît brusquement en une seule fois, mais en règle générale, elle s'obtient par paliers successifs.

La théorie de l'adaptation observe justement que la mise en évidence de la résistance aux drogues ne peut être faite sans cultiver le microorganisme en leur présence. La possibilité d'une action directe, d'une induction de la drogue sur l'apparition des cellules résistantes ne peut donc être exclue *a priori*.

HINSHELWOOD (24) s'est fait le champion de la théorie selon laquelle la drogue provoquerait dans la totalité de la population bactérienne une modification de son équipement enzymatique ou de ses voies métaboliques rendant possible la vie en présence du toxique. La drogue n'est pas simplement un agent de la sélection, elle induit la transformation de cellules sensibles en cellules résistantes avant de sélectionner ces dernières (1).

Chaque théorie est étayée par des exemples, c'est ainsi que WELSCH (60) montre l'hétérogénéité d'une culture de *Staphylococcus aureus* vis à vis de la streptomycine et sélectionne des cellules résistantes qu'il considère à bon droit semble-t-il comme des mutants ; au contraire COMI et MONOD (18) montrent l'apparition chez *Escherichia coli* d'un nouvel enzyme : la  $\beta$  galactosidase après culture en présence d'un galactoside inducteur, enzyme qui permet alors au germe d'utiliser un substrat nouveau.

Si l'on admettait que toutes les cellules formant une population bactérienne sont exactement semblables, il en résulterait qu'elles seraient capables de s'adapter toutes au même degré, à des conditions nouvelles ; ce n'est manifestement pas le cas. Une population bactérienne présente toujours un certain caractère d'hétérogénéité, aussi quelques cellules sont-elles probablement plus que d'autres, capables de subir avec succès l'assaut d'un



toxique ; en d'autres termes, si quelques unes des cellules ne sont pas résistantes avant le contact avec la drogue, elles le sont au moins à l'état potentiel par quelques différences de constitution chimique, de perméabilité, d'équipement enzymatique, etc...

La nature hétérogène d'une population bactérienne est elle alors le résultat de mutations ? Une origine mutationnelle peut être admise lorsque quelques cellules beaucoup plus résistantes que d'autres, sont décelées en une seule fois, mais quand des cellules présentant divers degrés de résistance coexistent, cela peut bien ne refléter rien de plus que les variations habituelles qui existent dans toute population et dont la distribution de Gauss rend compte.

Ces faits montrent la complexité du problème, Si dans quelques cas particuliers des explications valables ont pu être données, en règle générale, nous pouvons dire que nos connaissances sur la nature des changements qui préludent au développement de la résistance chez les microorganismes ne nous permettent pas toujours d'affirmer si c'est un phénomène de mutation ou d'adaptation qui intervient ou les deux à la fois.

HINSHELWOOD fait d'ailleurs remarquer, que si l'on va au fond des choses, que l'on envisage par exemple les modifications des nucléoprotéines qui semblent conditionner les mutations, les deux types de théorie (mutation et adaptation) diffèrent bien moins l'un de l'autre qu'il ne semble de prime abord.

## B) - ISOLEMENT D'UNE SOUCHE RESISTANTE

### I - Origine et identification de la souche de levure employée.

La levure employée au cours de ce travail est *Candida utilis* (Henneberg) NOV. COMB. Lodder, (*Torula utilis*, Henneberg 1926) qui nous a été fournie par le Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeast Division, de



Delft (Pays-Bas). Il s'agit d'une levure blanche ne sporulant pas.

Nous avons également effectué quelques expériences avec *Saccharomyces cerevisiae* isolée à partir d'une levure de boulangerie.

## II - Milieux de culture employés

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé deux milieux de culture différents. Un milieu purement synthétique et un milieu salin et saccharosé additionné de jus de levure. Ce dernier est difficilement toujours semblable à lui-même en raison de l'élément d'origine vivante qui entre dans sa composition ; de plus la levure pressée retient des quantités variables d'eau, elle est hygroscopique, or nous le verrons plus loin, l'extrait de levure influe sur la résistance apparente de *Candida* utilis au chlorure mercurique ; c'est pour éliminer ces causes de variation que nous avons utilisé un milieu entièrement synthétique dont la composition reste absolument constante.

### a) Milieu additionné de jus de levure

A la suite de nos prédécesseurs au Laboratoire, nous avons adopté le milieu suivant en raison du bon rendement en levure qu'il permet d'obtenir : (25)

|                                                 |        |          |
|-------------------------------------------------|--------|----------|
| Jus de levure (voir plus loin)                  | 250    | ml       |
| Saccharose                                      | 20     | g        |
| SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 3      | g        |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K                | 2      | g        |
| SO <sub>4</sub> Mg, 7 OH <sub>2</sub>           | 0,25   | g        |
| Cl <sub>2</sub> Ca anhydre                      | 0,25   | g        |
| Cl <sub>2</sub> Mn, 4 OH <sub>2</sub>           | 0,001  | g        |
| SO <sub>4</sub> Zn, 7 OH <sub>2</sub>           | 0,001  | g        |
| BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>                  | 0,001  | g        |
| Cl <sub>3</sub> Fe                              | 0,0005 | g        |
| SO <sub>4</sub> Cu, 5 OH <sub>2</sub>           | 0,0001 | g        |
| IK                                              | 0,0001 | g        |
| Eau distillée                                   | Q.S.p  | 1.000 ml |



Pour obtenir rapidement et commodément ce milieu, nous préparons d'abord les deux solutions stock suivantes :

| <u>Solution A</u>                     |        | <u>Solution B</u>                     |         |
|---------------------------------------|--------|---------------------------------------|---------|
| Cl <sub>2</sub> Ca                    | 25 g   | SO <sub>4</sub> Mg, 7 OH <sub>2</sub> | 25 g    |
| Cl <sub>2</sub> Mn, 4 OH <sub>2</sub> | 0,10 g | SO <sub>4</sub> Zn, 7 OH <sub>2</sub> | 0,10 g  |
| Cl <sub>3</sub> Fe                    | 0,05 g | BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>        | 0,10 g  |
| Eau distillée Q.S.p.                  | 100 ml | SO <sub>4</sub> Cu, 5 OH <sub>2</sub> | 0,01 g  |
|                                       |        | IK                                    | 0,01 g  |
|                                       |        | Eau distillée Q.S.p                   | 100 ml. |

D'autre part, nous préparons extemporanément le jus de levure selon la méthode de CONWAY et BREEN (19) : 25 g de levure de boulangerie pressée sont dispersés dans 250 ml d'eau distillée froide et portés à ébullition modérée que nous maintenons pendant une heure. Ensuite, la suspension est refroidie, centrifugée et le liquide surnageant est recueilli par décantation.

Nous ajoutons au jus de levure les quantités voulues de saccharose, de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> et de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, dissoutes dans 200 ml d'eau distillée environ, puis 1 ml des solutions A et B et nous complétons à 1.000 ml avec de l'eau distillée.

#### b) Milieu synthétique

|                              |       |    |
|------------------------------|-------|----|
| Thiamine (chlorhydrate)      | 0,4   | mg |
| Riboflavine                  | 0,2   | mg |
| Acide nicotinique            | 5     | mg |
| Acide paraaminobenzoïque     | 0,3   | mg |
| Adermine                     | 1     | mg |
| Pantothénate de calcium      | 0,5   | mg |
| Mesoinositol                 | 50    | mg |
| Biotine                      | 0,002 | mg |
| Acide-L-aspartique           | 100   | mg |
| Adénine                      | 20    | mg |
| Acide folique                | 0,002 | mg |
| L-Histidine monochlorhydrate | 10    | mg |



|                                                 |        |    |
|-------------------------------------------------|--------|----|
| L-tryptophane                                   | 20     | mg |
| DL méthionine                                   | 20     | mg |
| Saccharose                                      | 20     | g  |
| SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 5      | g  |
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K                | 2      | g  |
| ClNa                                            | 0,100  | g  |
| SO <sub>4</sub> Mg, 7 OH <sub>2</sub>           | 0,250  | g  |
| Cl <sub>2</sub> Ca anhydre                      | 0,250  | g  |
| Cl <sub>2</sub> Mn, 4 OH <sub>2</sub>           | 0,001  | g  |
| SO <sub>4</sub> Zn, 7 OH <sub>2</sub>           | 0,001  | g  |
| BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>                  | 0,001  | g  |
| Cl <sub>3</sub> Fe                              | 0,0005 | g  |
| SO <sub>4</sub> Cu, 5 OH <sub>2</sub>           | 0,0001 | g  |
| IK                                              | 0,0001 | g  |
| Eau distillée Q.S.p                             | 1.000  | ml |

Les quantités indiquées de vitamines et d'acides aminés sont dissoutes dans 10 ml d'eau distillée en chauffant légèrement pour hâter la dissolution. Toutefois en ce qui concerne l'acide folique et la biotine, dont les doses nécessaires sont très faibles, nous en préparons une solution contenant 0,01 g pour 1.000 et nous ajoutons 0,2 ml de cette solution à la solution stock des vitamines et acides aminés. Cette solution stock est mise soit en ampoules, soit en tubes à essais bouchés au coton cardé, puis stérilisée à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes et conservée à 4° C. Les ampoules ou tubes à essais sont utilisés au moment du besoin.

Nous préparons le milieu synthétique en ajoutant au contenu d'une ampoule ou d'un tube à essais le saccharose, SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, ClNa dissous dans 200 ml d'eau distillée environ, puis 1 ml des solutions A et B déjà utilisées pour le milieu à base de jus de levure et nous complétons à 1.000 ml avec de l'eau distillée.

Nos différentes souches de levure sont conservées sur milieu gélosé à 20 g par litre.

Pour cultiver la levure en présence de chlorure mercurique, nous complétons les milieux à 900 ml seulement, ce qui permet d'ajouter la



solution de chlorure mercurique sans diluer le milieu ; nous complétons ensuite à 1.000 ml.

Les milieux sont généralement répartis en tubes de 180 x 10 mm ou en erlenmeyers puis stérilisés à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes.

### III - Solution de chlorure mercurique

Le chlorure mercurique pesé à la balance de précision est dissous dans un volume donné d'eau distillée stérile, sans passage à l'autoclave pour éviter son hydrolyse.

En effet, le chlorure mercurique est instable en solution aqueuse (48) ; la fraction hydrolysée, faible en solution relativement concentrée, augmente avec la dilution et la température ; c'est pourquoi nos solutions de chlorure mercurique bien que conservées au froid sont renouvelées au moins chaque semaine.

L'incorporation du chlorure mercurique dans les milieux de culture se fait au moment de l'ensemencement comme il vient d'être dit.

### IV - Conditions opératoires et mesure du développement bactérien

La verrerie est lavée au mélange sulfochromique, rincée abondamment à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, séchée et stérilisée à l'autoclave.

Nous effectuons nos cultures à 30° en plongeant les fioles dans une cuve remplie d'eau dont la température est maintenue constante grâce à un thermostat comportant un mécanisme d'agitation. Cette régulation de la température est importante, en effet *Candida utilis* est très sensible aux variations de température. A 37°, sur milieu additionné de jus de levure, la croissance atteint son maximum en 48 heures au lieu de 24 heures à 30°. De plus la toxicité du chlorure mercurique vis à vis des germes varie



également dans le même sens que la température (62).

L'oxygénation des milieux de culture ne peut être facilement réalisée par passage d'un courant d'oxygène ou même d'air dans de nombreux tubes ou fioles contenant des microorganismes. Nous nous sommes contentés d'une agitation du milieu, obtenue soit par un dispositif électromagnétique, soit par emploi du dispositif oscillant que comportent les appareils de Warburg (60 oscillations par minute).

Pour réaliser les cultures de *Candida utilis* selon des conditions toujours identiques nous effectuons chaque ensemencement de la manière suivante : dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 18 ml de milieu concentré au 9/10 ainsi que la solution de chlorure mercurique, nous ajoutons 0,5 ml d'une suspension de levure prélevée dans une culture de 24 heures en fin de croissance, ayant une densité optique voisine de 120. Si la densité optique de la culture qui nous sert à ensemercer est différente de 120, nous modifions en conséquence le volume de l'inoculum afin d'obtenir pour chaque culture une densité optique initiale comprise entre 11 et 13. En effet, le volume de l'inoculum influe notablement sur la toxicité apparente du chlorure mercurique. Nous complétons enfin à 20 ml avec de l'eau distillée stérile.

Pour apprécier la croissance de nos cultures bactériennes, nous avons choisi la mesure du trouble produit ; c'est la méthode la plus commode lorsqu'il s'agit de faire de nombreuses déterminations. Ces mesures de densité optique nous ont conduit à employer pour nos cultures des erlenmeyers de 100 ml possédant une tubulure latérale calibrée, en verre pyrex de 18 mm de diamètre ; des essais de contrôle nous ont montré que ces tubes présentent tous la même densité optique pour une même suspension de germes. Cette tubulure latérale nous permet par une simple inclinaison de l'erlenmeyer de faire une mesure néphélométrique du développement bactérien, sans avoir à effectuer de prélèvement.

Les mesures néphélométriques sont effectuées au moyen du



spectrophotomètre "Coleman junior" avec une lumière incidente d'une longueur d'onde de 610 m $\mu$  (longueur d'onde qui permet d'avoir le maximum de sensibilité de l'appareil). Cette méthode de mesure du développement bactérien avait donné satisfaction à nos prédécesseurs dans ce Laboratoire ; on en trouvera une étude critique dans la thèse de POUCHOL (51).

Les résultats sont exprimés en densité optique (cologarithme de la transmittance) et nous nous sommes conformé à la pratique courante qui consiste à multiplier par 100 la valeur lue de la densité optique. La densité optique est proportionnelle aux concentrations et aux opacités, car la loi de Beer-Lambert s'applique dans le cas de nos cultures, si toutefois l'opacité reste inférieure à une certaine limite (la densité optique doit restée inférieure à 120).

#### V - Techniques employées pour obtenir une souche de Candida utilis résistante au chlorure mercurique.

(Cultures effectuées sur milieu additionné de jus de levure).

La plupart des auteurs qui ont cherché à augmenter la résistance des germes au chlorure mercurique donnent peu de renseignements sur les modalités selon lesquelles cette résistance s'est établie. BENIGNO et SAINTI (7) signalent simplement que l'adaptation survient par passages successifs sur des milieux de culture ayant une concentration croissante en chlorure mercurique. SELIBER et KATZNELSON (54) cultivent la levure sur une concentration donnée en chlorure mercurique, la levure acquiert progressivement une croissance normale. Nous n'avons trouvé qu'IMSHENESKI et PEROVA (38) pour donner plus de détails sur la méthode qu'ils ont employée avec *Saccharomyces cerevisiae* ; ces auteurs recommandent d'augmenter la concentration en chlorure mercurique des milieux avec beaucoup de précautions parce qu'une dose trop élevée augmente le temps de latence des cultures et ensuite celles-ci dégè- nèrent ; d'autre part, IMSHENESKI et PEROVA effectuent un passage sur milieu dépourvu du toxique toutes les 20 ou 30 cultures environ pour favoriser



l'adaptation en donnant plus de vitalité aux levures. C'est pour ces raisons dont quelques essais préliminaires nous avaient permis d'apprécier la valeur, que nous avons pris pour règle de rejeter au cours de nos cultures en série, toute levure qui n'a pas achevé son développement en 24 heures. En effet, dans les conditions expérimentales que nous nous sommes fixées et en absence de chlorure mercurique, *Candida utilis* croît entièrement en 15 à 18 heures, sa densité optique après 24 heures est toujours supérieure à 120. C'est pourquoi nous rejetons toute culture qui, sur milieu contenant du chlorure mercurique, n'a pas atteint en 24 heures une densité optique voisine de 120.

Lesensemencements sont effectués quotidiennement dans plusieurs fioles contenant des concentrations régulièrement croissantes de chlorure mercurique. Au bout de 24 heures, nous utilisons pour effectuer un nouvel ensemencement, la culture qui a poussé sur la plus forte concentration en chlorure mercurique, à condition que la densité optique atteinte soit supérieure à 120 ou proche de cette valeur.

Sur milieu additionné de jus de levure, *Candida utilis* a une croissance rapide. Un ensemencement effectué à partir d'une culture de levure normale âgée de 24 heures, c'est à dire ayant déjà atteint son maximum de croissance, présente un temps de latence voisin de 2 heures ; la phase logarithmique de croissance débute au bout de 4 heures environ ; la croissance maximum est atteinte en 15 à 18 heures, la densité optique lue est alors de 125-135 (voir graphique n° 2, page 22).

Au cours de nos premières expériences, nous avons déterminé la concentration en chlorure mercurique qui n'entraîne pas de retard sensible dans la croissance de *Candida utilis*. Une dose aussi faible que 100  $\mu$  g de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu de culture (c'est à dire une concentration du millionième) provoque une augmentation du temps de latence de quelques heures mais la croissance est normale en 24 heures, tandis que sur 150  $\mu$  g de chlorure mercurique la croissance n'est pas terminée en 24 heures.



Au cours de notre tentative d'adaptation de *Candida utilis* au chlorure mercurique, nous sommes partis de la souche mère conservée sur milieu gélosé. Après avoir effectué trois passages sur milieu normal où les temps de pousse ont été respectivement de 17 heures, 15 heures et 15 heures, la levure a poussé en 24 heures sur une concentration en chlorure mercurique du millionième, puis au deuxième passage sur la concentration double (voir graphique n° 1 p. 17).

Nous avons poursuivi les cultures avec des inoculats importants (densité optique initiale variant entre 13 et 20) ce qui a entraîné une résistance de la levure à 250  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu. Puis à partir du huitième passage, nous avons tenu compte pour ensemençer du nombre de germes afin d'avoir une densité optique initiale comprise entre 11 et 13. *Candida utilis* a toléré à nouveau 150  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml mais non la concentration maximum que nous avons atteinte soit 250  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml. Ce qui souligne le rôle de l'importance de l'inoculum sur la dose maximum de chlorure mercurique toléré. La résistance au sublimé n'augmentant plus nous avons effectué un repiquage : le 13ème, sur milieu normal puis, la résistance a alors augmenté dans les repiquages suivants puisqu'à la 15ème et 16ème cultures, 250  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml ont été bien tolérés. La 17ème et 18ème cultures n'ont pas poussé correctement sur des doses supérieures de sublimé. A partir du 19ème passage, la concentration de chlorure mercurique que supporte la levure s'est mise à croître assez régulièrement jusqu'à 700  $\mu$ g pour 100 ml, concentration atteinte lors du 26ème passage. Nous avons été surpris par cette augmentation rapide de la tolérance au mercure, aussi n'avons nous pas testé des doses progressivement supérieures ; il n'est pas exclu que la concentration maximum (700  $\mu$ g pour 100 ml) aurait pu être atteinte plus vite. Néanmoins au 23ème passage, la levure ensemençée sur une dose supérieure de 50  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml n'a pas poussé tandis qu'au 25ème passage, sa croissance sur ce milieu n'a pas été satisfaisante. La levure poussant moins bien au 28ème passage, nous effectuons

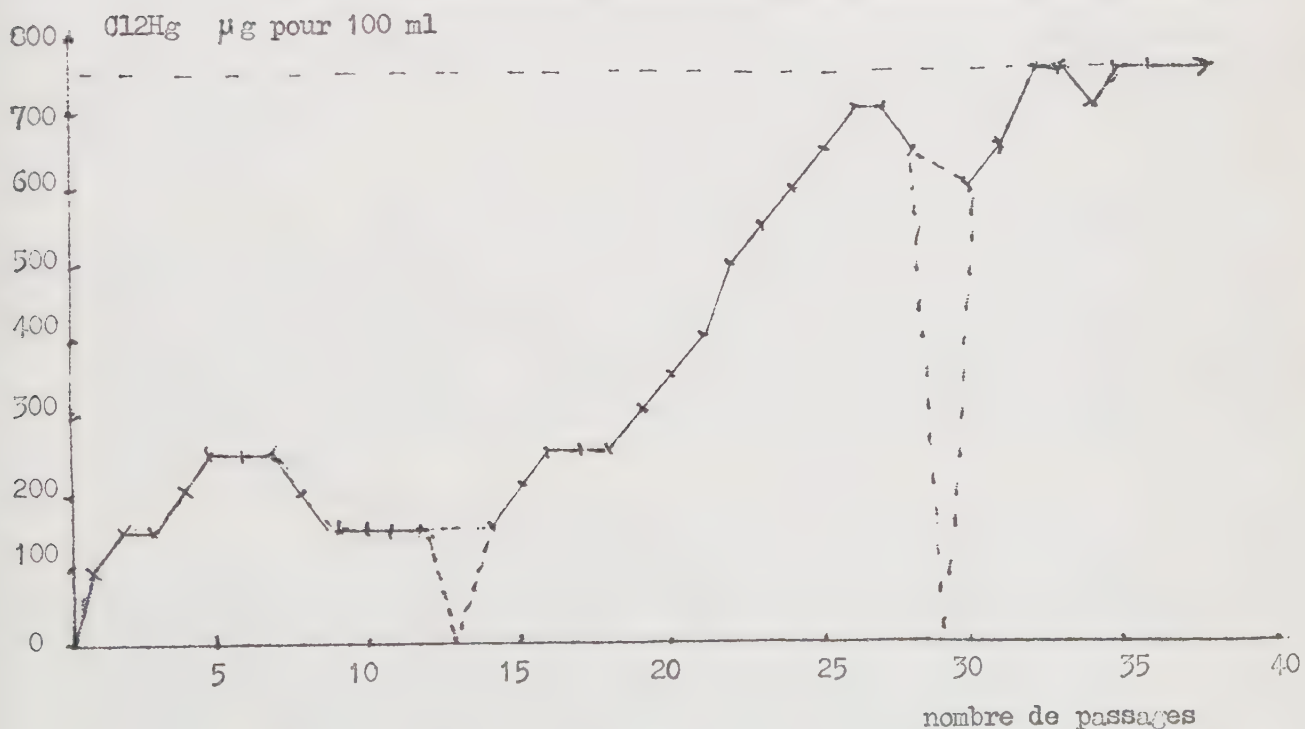


le 29ème passage sur milieu normal et nous atteignons au 32ème, la concentration de 750  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml. Nous sommes arrivés à un palier dans la résistance de la levure, palier qui constitue un maximum et ne sera pas dépassé, même après plus de 350 passages ininterrompus sur chlorure mercurique.

La levure résiste donc à des concentrations de 1/140.000 à 1/125.000 de chlorure mercurique. Certains ensemencements effectués avec une culture âgée de 48 heures au lieu de 24 n'ont présenté aucune différence de croissance ultérieure.

GRAPHIQUE N° 1

Courbe d'adaptation de Candida utilis au chlorure mercurique



Vu la grande sensibilité de *Candida utilis* au chlorure mercurique, il arrive parfois que sans cause apparente, la levure pousse mal



ou ne pousse pas, nous effectuons alors un passage sur milieu normal et ensuite sur des concentrations croissantes du toxique, la levure atteint à nouveau son niveau maximum de résistance après 2 ou 3 passages sur des concentrations inférieures en chlorure mercurique.

Après un certain nombre de passages sur milieu contenant du chlorure mercurique, nous avons remarqué que le degré de résistance de la levure varie et nous avons attribué ce fait à l'inconstance du jus de levure entrant dans la composition du milieu puisque tous les autres composants sont définis : par exemple, la résistance de notre souche au chlorure mercurique, qui est de 750  $\mu$ g pour 100 ml, s'élève brusquement à 850  $\mu$ g par simple changement du milieu de culture, et rétrograde à la valeur initiale si on ensemence à nouveau la levure sur le premier milieu. Nous avons vérifié cette hypothèse en cultivant la levure sur milieu contenant un jus de levure préparé avec 35 g de levure de boulangerie fraîche et pressée ; *Candida utilis* pousse alors sur 1.400  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml de la même façon qu'elle pousse sur 750  $\mu$ g lorsque le milieu était préparé avec 25 g de levure.

Pour montrer que la concentration maximum à laquelle résiste *Candida utilis* est relativement constante, nous avons transféré la souche résistante sur milieu purement synthétique ; le degré de résistance de la levure y est plus faible : 300-350  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml, mais reste sensiblement constant même après plus de 50 passages consécutifs sur ce milieu.

Cette concentration maximum en chlorure mercurique est définie d'après les conditions expérimentales que nous avons prises comme base au début de nos cultures, à savoir que la culture doit atteindre son complet développement en 24 heures ; cela ne veut pas dire que la levure ne pousse pas sur des concentrations supérieures de toxique, mais le temps de latence augmente rapidement, de quelques heures pour une élévation de la concentration de 50  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml, 24 heures et plus pour 150  $\mu$ g



et au delà.

Nous avons donc obtenu une souche de *Candida utilis* qui résiste à des concentrations en chlorure mercurique nettement supérieures à celles que la souche normale peut tolérer et qui sont respectivement de :

700 - 800  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu additionné de jus de levure alors que la souche normale ne tolère que 100  $\mu\text{g}$  dans les mêmes conditions.

300 - 350  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu synthétique alors que la souche normale ne tolère que 50  $\mu\text{g}$ .

Ainsi, soit sur milieu synthétique, soit sur milieu additionné de jus de levure, la souche résistante supporte une concentration en chlorure mercurique 7 fois supérieure à celle tolérée par la souche mère.

Néanmoins si la dose initiale de chlorure mercurique reste faible, la différence entre la souche normale et la souche rendue résistante ressort plus nettement de la comparaison de leurs temps de latence sur des concentrations identiques du toxique. Ainsi le temps de latence a pu être ramené :

a) sur milieu additionné de jus de levure, de 30 - 60 heures (souche normale) à 6 - 8 heures (souche résistante)

b) sur milieu synthétique, de 5 - 6 jours (souche normale) à 6 - 8 heures (souche résistante).

La différence de durée de latence entre souche normale et souche résistante est particulièrement importante sur milieu synthétique. Aussi avons-nous étudié sur ce milieu la croissance de *Candida utilis* souche normale cultivée sur des concentrations régulièrement croissantes de chlorure mercurique.



TABLEAU N° 1

Croissance de Candida utilis souche normale sur  
milieu synthétique

| Concentration en<br>chlorure mercurique<br>( $\mu$ g pour 100 ml) | Temps de<br>latence | Fin de croissance |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| 0                                                                 | 2 h                 | 14 - 15 h         |
| 50                                                                | 2 - 8 h             | 15 - 30 h         |
| 100                                                               | > 7 h               | 30 h              |
| 150                                                               | 36 h                | 2 - 3 j           |
| 200                                                               | > 3 j               | 4 j               |
| 250                                                               | 4 1/2 j             | 5 j               |
| 300                                                               | 5 1/2 j             | 6 j               |
| 350                                                               | > 6 j               | 7 j               |
| 400                                                               | > 6 1/2 j           | 7 1/2 j           |
| 500                                                               | > 8 j               | 9 j               |

Ces résultats sont la moyenne de deux essais différents et concordants.

Si nous augmentons encore la concentration en chlorure mercurique, le temps de latence continue à augmenter jusqu'au moment où la levure est tuée.

Rappelons que la concentration sur laquelle la souche résistante pousse normalement est de 350  $\mu$ g pour 100 ml.

Nous avons enfin étudié la croissance de Candida utilis sur milieu additionné de jus de levure : la souche normale croissant sur milieu



normal et la souche résistante sur milieu additionné de chlorure mercurique à la concentration de 750  $\mu$ g pour 100 ml.

Nos résultats sont consignés dans le tableau n° 2

TABLEAU N° 2

Analyse de la croissance de Candida utilis

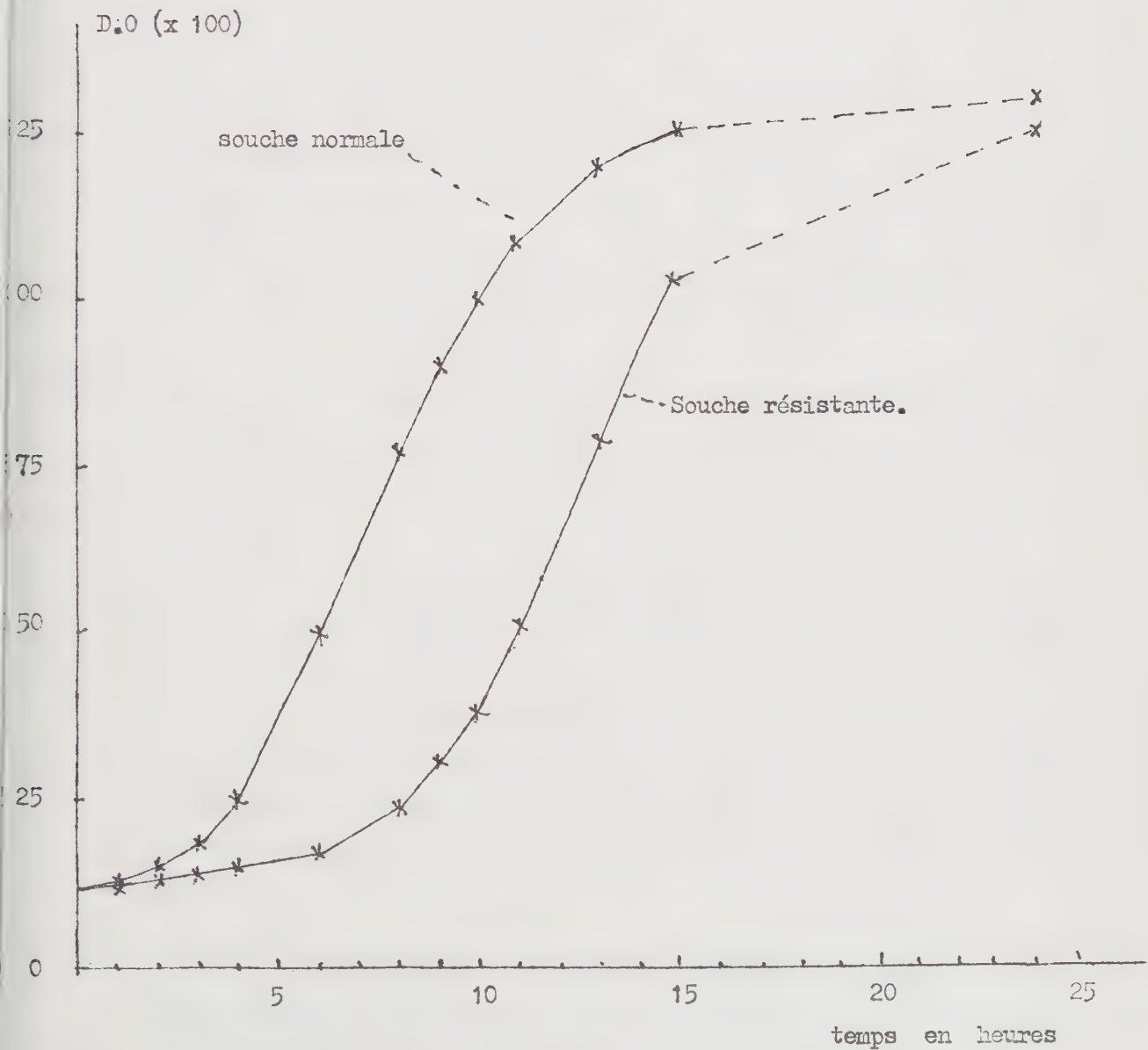
| Temps en heures | Densité optique ( x 100)         |                                                         |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                 | Souche normale sur milieu normal | Souche résistante en présence de $\text{Cl}_2\text{Hg}$ |
| 0               | 12                               | 12                                                      |
| 1               | 13                               | 12,5                                                    |
| 2               | 15                               | 13,5                                                    |
| 3               | 18,5                             | 14,5                                                    |
| 4               | 25                               | 15                                                      |
| 6               | 50                               | 17                                                      |
| 8               | 77                               | 24                                                      |
| 9               | 90                               | 30,5                                                    |
| 10              | 100                              | 38                                                      |
| 11              | 109                              | 51                                                      |
| 13              | 120                              | 79                                                      |
| 14              | 123                              | 92                                                      |
| 15              | 125                              | 103                                                     |
| 24              | 130                              | 125                                                     |

Le graphique n° 2 traduit par des courbes de croissance les résultats figurant dans ce tableau.



GRAPHIQUE N° 2

Croissance de *Candida utilis* souche normale sur milieu normal  
et souche résistante sur milieu additionné de chlorure mercurique.





L'expérience que nous rapportons, est effectuée sur milieu additionné de jus de levure ; sur milieu synthétique, les résultats sont analogues.

Les deux courbes sont à peu près identiques, la courbe de croissance de la souche résistante est décalée vers la droite parce qu'elle présente par rapport à la souche normale une augmentation du temps de latence d'environ 5 heures. Elle se développe également un peu plus lentement parce que la phase logarithmique est plus lente à s'établir. Mais les vitesses de croissance des deux souches, en phase logarithmique, sont identiques, les droites représentatives sont alors sensiblement parallèles ; c'est ainsi que la densité optique de la souche normale augmente de 25 à 77 en 4 heures, c'est à dire de 13 unités par heure et la densité optique de la souche résistante de 38 à 92 en 4 heures, c'est à dire de 13,5 unités par heure .

Quant à la souche normale, placée sur milieu plus ou moins riche en chlorure mercurique, son temps de latence augmente comme nous l'avons vu en fonction de la concentration, mais lorsque la croissance devient apparente elle est aussi rapide que celle de la souche résistante.

#### VI - Tentatives pour augmenter la résistance au chlorure mercurique de Candida utilis "souche résistante".

Nous avons rapporté précédemment comment nous avons pu obtenir une souche de Candida utilis relativement résistante au chlorure mercurique ; la concentration supportée, soit 750  $\mu$ g pour 100 ml, n'a pas augmenté depuis le 35ème passage sur milieu mercurique, bien que nous ayons effectué un nombre élevé de subcultures.

Nous avons alors essayé d'accroître le degré de résistance de la levure par d'autres procédés : augmentation de la dose initiale de chlorure mercurique, modification du milieu de culture par augmentation de la teneur en l'un de ses composants ou par addition d'un produit nouveau.



Dans une première série d'expériences, nous avons fait croître la souche résistante sur une dose initiale de chlorure mercurique double de la concentration maximum permettant la croissance normale de la levure, c'est à dire sur 1.500  $\mu$  g de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu. Le temps de latence augmente, la levure ne pousse qu'en 3 ou 4 jours. Nous pouvions penser que l'augmentation de la résistance au chlorure mercurique si elle se produisait, se traduirait par une diminution progressive du temps de latence jusqu'à obtention d'une croissance normale en 24 heures. Il n'en a rien été, après 11 passages successifs, c'est à dire après plus d'un mois de subcultures, le temps mis par la levure pour croître n'a pratiquement pas varié, il s'est plutôt légèrement accru.

Nous avons ensuite augmenté la concentration du jus de levure du milieu qui en contient, utilisant 35 g de levure de boulangerie pressée par litre de milieu au lieu de 25 g. Comme nous l'avons déjà signalé à propos de l'emploi du milieu synthétique (page 18) la levure a pu croître en présence de 1.400  $\mu$  g de chlorure mercurique pour 100 ml. Mais par passage ultérieur sur le milieu habituel préparé avec 25 g de levure de boulangerie, *Candida utilis* a vu à nouveau sa résistance apparente rétrograder à 750  $\mu$  g de chlorure mercurique pour 100 ml. Cette augmentation de résistance au toxique n'est donc pas due à la levure elle-même, mais à une action détoxicante plus élevée du milieu de culture.

Des résultats analogues ont été obtenus, par addition au milieu de culture de quantités variables de cystéine. Nous avons développé plus longuement cette question page 80. Signalons simplement ici que nous n'avons pas réussi à augmenter la résistance propre des levures au chlorure mercurique. Après plusieurs passages sur milieu normal contenant une forte proportion de cystéine, la levure ne présente aucun accroissement de résistance au toxique étudié ; de même après plusieurs cultures successives en présence de cystéine et de concentrations relativement fortes de chlorure mercurique, la levure cultivée à nouveau sur milieu normal montre que son degré de résistance initiale au mercure n'a pas varié.



Enfin nous avons cultivé *Candida utilis* sur milieu synthétique contenant 4 fois plus de sulfate d'ammonium, c'est à dire 20 g par litre de milieu. Nous pouvions penser en effet que les ions  $\text{SO}_4^{--}$  et  $\text{NH}_4^+$  étant les points de départ de la biosynthèse de la cystéine, donc des groupements SH des protéines, une plus forte teneur du milieu en sulfate d'ammonium augmenterait cette biosynthèse chez la levure. D'autre part, vu la grande affinité du mercure pour les groupements -SH, la levure supporterait une plus forte concentration de mercure. Cette hypothèse n'a pas été confirmée, même après 13 passages consécutifs sur ce milieu.

Nous voyons donc que nos efforts pour augmenter la résistance au chlorure mercurique de *Candida utilis* "souche résistante" ont été vains.

#### VII - Discussion et conclusion.

Nous avons obtenu une souche indubitablement plus résistante au chlorure mercurique que la souche normale, en effet, notre souche supporte une concentration de chlorure mercurique 7 fois supérieure à la concentration sur laquelle la souche mère peut croître à peu près normalement. Il est logique que nous ayons cherché à analyser la nature du processus qui nous a permis d'obtenir la souche résistante car nous avons vu qu'il existe deux types de théorie : mutation et adaptation qui toutes deux peuvent rendre compte de l'apparition de la résistance aux drogues chez les microorganismes.

Par quel mécanisme (mutation ou adaptation) notre souche résistante a-t-elle été isolée ? Si nous analysons notre cas, nous voyons qu'il est difficile de répondre avec netteté ! La résistance n'est apparue qu'après plusieurs passages de la levure sur milieu mercuriel, elle n'a pas été maximum d'emblée, ce qui peut faire penser à une adaptation. Mais d'un autre côté, la résistance s'est établie assez rapidement au cours de 12 passages consécutifs et n'a pas varié ensuite après plus de 350 subcultures sur milieu mercuriel. De plus elle n'a pu être modifiée en augmentant la concentration initiale du chlorure mercurique ou en repiquant la souche résistante



sur milieu normal. Nous n'avons pu reproduire cette acquisition de la résistance chez *Candida utilis* cultivé sur milieu synthétique. Ces faits s'expliqueraient plutôt par l'hypothèse d'une mutation survenue par hasard, que nous avons pu caractériser, mais que nous ne sommes pas maître de reproduire.

Nous voyons donc que si nous avons obtenu une souche résistante au chlorure mercurique, nous ne pouvons pas préciser clairement le mécanisme par lequel cette résistance a été acquise.

\*

\*

\*



ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE LE CHLORURE MERCURIQUE ET  
CANDIDA UTILIS, SOUCHE NORMALE ET SOUCHE RESISTANTE

Nous avons vu que la levure normale, cultivée sur une concentration suffisante de chlorure mercurique, ne pousse qu'après plusieurs jours de latence, tandis que la levure résistante croît normalement en 24 heures. Quelles modifications se sont produites dans la levure ou le milieu, capables de rendre compte de ce phénomène ? Un essai préliminaire nous ayant montré que l'ion mercurique a totalement disparu du milieu de culture lorsque la croissance est terminée, nous avons eu l'idée d'étudier la destinée du chlorure mercurique ajouté au milieu de culture.

Le plan que nous avons suivi pour exposer ces recherches est le suivant :

- A) - Nous décrivons d'abord les techniques utilisées pour le dosage du mercure, en particulier celles que nous avons adoptées.
- B) - Nous traitons ensuite de la fixation et de la pénétration du mercure dans la levure.
- C) - Nous poursuivons une étude cinétique portant sur l'ionisation du mercure restant dans le milieu de culture et sur la fixation du mercure par la levure au cours de son développement.
- D) - Enfin, nous mettons en évidence la formation d'un composé mercuriel volatil lorsque la levure se développe en présence de chlorure mercurique.

A) - TECHNIQUES UTILISEES POUR LE DOSAGE DU MERCURE

Malgré la multiplicité des méthodes de dosage du mercure que nous offre la littérature scientifique, notre choix a été assez rapide,



déterminé qu'il était par le but que nous nous proposons d'atteindre.

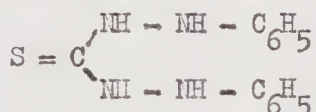
Nous devons en effet choisir une méthode assez sensible pour pouvoir déterminer quantitativement quelques microgrammes de mercure, souvent à une très faible concentration ; d'autre part, notre méthode de dosage devait être assez simple et rapide pour nous permettre d'effectuer un certain nombre de dosages dans la même journée.

# I - Méthode employée dans nos recherches : dosage proprement dit.

Nous avons employé la méthode colorimétrique à la dithizone décrite par CHARLOT et BEZIERS (16) dans leur ouvrage intitulé "Analyse quantitative minérale".

En effet, elle permet le dosage de très faibles quantités de mercure (quelques  $\mu\text{g}$ ), elle est sélective en milieu acide, elle se prête bien aux dosages en série.

La dithizone ou diphenylthiocarbazone

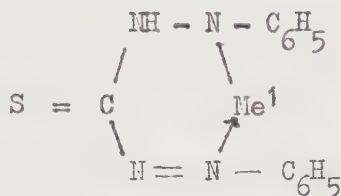


est soluble dans des solvants organiques, en donnant une solution colorée en vert. A l'état de molécules, en milieu acide ou neutre elle est extrêmement peu soluble dans l'eau ; en milieu alcalin la solubilité apparente croît par suite de l'ionisation.

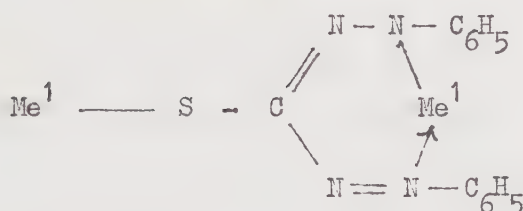


Avec de nombreux ions métalliques, il se forme des dithizonates colorés peu solubles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques : tétrachlorure de carbone et chloroforme par exemple. Selon la réaction du milieu, ils ont les formules suivantes :





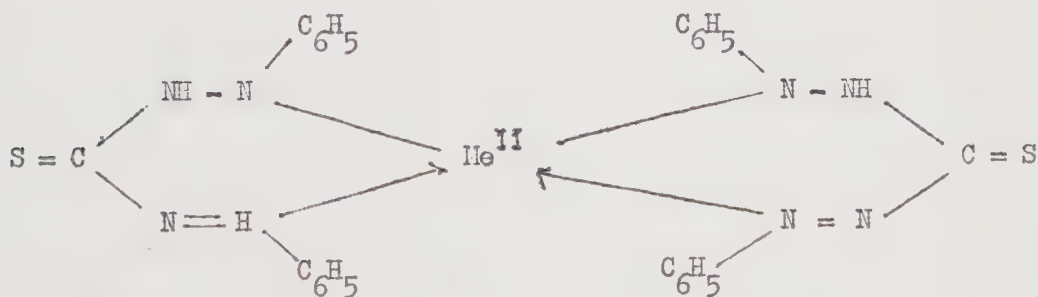
(forme cétonique stable en milieu acide ou neutre)



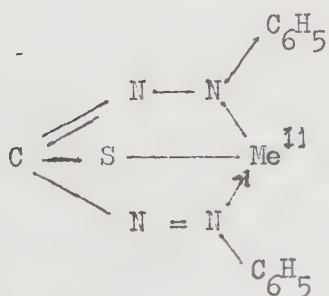
(forme énolique stable en milieu alcalin)

Cette dernière forme est en général peu soluble dans le tétrachlorure de carbone et le chloroforme.

D'après VASAK et SEDIVEC (59), les complexes avec les métaux bivalents ont probablement les structures suivantes :



(forme cétonique)



(forme énolique)



Tous les métaux connus forment des complexes de la forme cétonique, mais ceux de la forme énolique n'ont été obtenus que rarement.

L'extraction des dithizonates est actuellement la méthode la plus générale de séparation et de dosage des traces de certains métaux. En général, elle convient pour les quantités d'éléments comprises entre 0,1 et 200 microgrammes.

C'est FISCHER et LEOPOLDI qui ont les premiers en 1932 utilisé la dithizone pour doser l'ion mercurique. Cette méthode qui manquait alors de sélectivité, la dithizone formant des dithizonates avec les autres ions métalliques présents, a été modifiée à plusieurs reprises pour augmenter sa spécificité et la technique décrite par CHARLOT et BEZIER est celle qui a été mise au point par VASAK et SEDIVEC (59). Ces auteurs opèrent en milieu tamponné vers pH 4,5 - 5 et en présence d'un agent complexant : le complexon III qui est le sel disodique de l'acide éthylène diaminetétracétique.

Les complexes métalliques de cet acide, appelés "complexonates" sont très stables et seulement dans quelques cas exceptionnels, ils donnent les réactions du cation libre avec certains réactifs hautement sensibles. La majorité des éléments, sous forme de complexonates, ne réagit pas avec la dithizone sauf les ions monovalents, or, argent et divalents mercure, et probablement platine (29). Comme l'or et le platine donnent facilement par oxydation un élément à valence plus forte, ils sont complexés à leur tour ; ainsi dans des conditions opératoires déterminées, le dithizonate de mercure (ion mercurique) est extrait quantitativement et seul le complexe de l'argent est extrait en même temps (59). Mais l'argent ne se trouve ni dans la levure, ni dans le milieu de culture, et n'est pas une impureté à craindre dans les produits chimiques employés, il ne nous a donc pas gêné aux cours de nos dosages. Le dithizonate de mercure en solution dans le tétrachlorure de carbone est orangé ; stable lorsque le pH du milieu est supérieur à I, il se prête facilement à une détermination colorimétrique,



sa solution suit assez bien la loi de Beer-Lambert (27).

## II - Mode opératoire

### a) Minéralisation

La méthode que nous venons de décrire ne dose pas toutes les formes de mercure qui peuvent se trouver dans un milieu complexe. Aussi est-il nécessaire, pour amener la totalité du mercure sous forme ionisée, de minéraliser le milieu de culture.

La multiplicité des méthodes de minéralisation utilisées nous laisse entrevoir la difficulté du problème. En effet, la volatilité bien connue des sels de mercure peut provoquer des pertes importantes dans l'emploi de toute technique de destruction insuffisamment étudiée.

Comme nous avons des liquides à minéraliser (milieux de culture) nous avons eu recours aux techniques procédant par voie humide, elles sont toutes basées sur l'action d'un acide minéral fort ou d'un mélange d'acides accompagnés ou non d'adjuvants (14) (46).

Après quelques essais qui ne nous ont pas donné satisfaction avec l'acide sulfurique seul, nous avons eu recours à l'action du chlore naissant fourni par le mélange acide chlorhydrique + chlorate de potassium. L'addition préalable d'acide nitrique permet une minéralisation beaucoup plus rapide des levures. (12)

Pour éviter les pertes de mercure par volatilisation, nous effectuons nos minéralisations dans des ballons pyrex de 100 ou 250 ml munis d'un col rodé, permettant d'adapter un réfrigérant. Dans chaque ballon, nous plaçons quelques billes de verre pour éviter les soubresauts que l'ébullition de la masse liquide provoquerait. Nous versons alors la prise d'essai à minéraliser : milieu de culture ou levures, qui sont transférées quantitativement dans le ballon à l'aide d'un peu d'eau distillée, puis nous ajoutons pour une culture de 20 ml, environ 5 ml d'acide chlorhydrique R.P. et 2 ml



d'acide nitrique R.P. nous chauffons modérément au bain de sable. Après 20 minutes, nous ajoutons par la partie supérieure du réfrigérant, du chlorate de potassium, par petites portions, toutes les 10 minutes, jusqu'à l'insolubilité et coloration jaune paille du minéralisé, ensuite nous continuons à chauffer pendant une heure.

Pour le dosage ultérieur du mercure et après refroidissement, nous transférons le minéralisé dans un ballon jaugé afin de pouvoir effectuer le dosage sur une prise d'essai contenant moins de 25  $\mu$ g en mercure. Le minéralisé est filtré au préalable sur papier filtre pour retenir les matières résineuses, qui provoqueraient une émulsion par agitation ultérieure avec une solution de tétrachlorure de carbone. Pour éviter l'oxydation de la dithizone qui sera ajoutée ultérieurement, nous passons en milieu réducteur en ajoutant à la prise d'essai un léger excès de bisulfite de sodium (0,5 ml de la solution commerciale à 36 Bé. suffit) qui détruit l'excès d'oxydant mais laisse le mercure à l'état mercurique.

#### b) Dosage de l'ion mercurique

##### I - Réactifs

##### Solutions de dithizone

Solution mère à 1 pour 1.000 obtenue par simple dissolution de 1 g de dithizone R.P., dans 1.000 ml de tétrachlorure de carbone R.P.

Cette solution est conservée au froid, à l'abri de la lumière sous une couche de sulfite de sodium 0,1 M de densité 1,12 (faite avec de l'eau bidistillée bouillie) pour éviter l'action de l'oxygène de l'air.

Elle est renouvelée au moins chaque mois.

Avant chaque dosage, à partir de la solution mère, nous préparons une solution à la concentration de 1/50.000, c'est à dire renfermant 2 ml de solution mère dans 100 ml de tétrachlorure de carbone R.P.



Ces solutions sont préparées et conservées dans une verrerie exempte de métaux, c'est à dire lavée au préalable avec une solution de dithizone.

#### Tampon acéto-acétique

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Acétate de sodium R.P. | 56 g   |
| Acide acétique R.P.    | 24 ml. |
| Eau distillée Q.S.p    | 100 ml |

#### Solution de complexon III

préparée par dissolution de 5 g de sel disodique de l'acide éthylène diamino-tétracétique dans 100 ml d'eau distillée.

#### Solution d'ammoniaque 0,2 N

Cette solution destinée à enlever l'excès de dithizone mélangé avec le dithizonate de mercure, doit être exempte de métaux, aussi la préparons-nous avec de l'eau bidistillée. Comme celle de dithizone, cette solution est conservée dans une verrerie exempte de métaux.

#### Solution de chlorure mercurique

- a) solution mère à 1 pour 1.000 dans l'eau distillée.
- b) solution à 13,5  $\mu$ g par ml dans l'eau distillée, préparée à partir de la solution mère. Cette solution, employée pour établir les courbes de référence, ne se conservant pas, est renouvelée à chaque essai.

### 2 - Technique utilisée

Dans une ampoule à décantation de 250 ml, nous versons 50 à 100 ml de la solution à doser qui doit contenir moins de 25  $\mu$ g de mercure ; puis nous ajoutons 10 ml de solution tampon et nous contrôlons le pH de la solution au moyen de papier indicateur ; ce pH doit être compris entre 4,5 et 5 ; si l'acidité apportée par la prise d'essai est assez importante pour avoir fait baisser le pH, nous ajoutons à nouveau 10 ml de tampon jusqu'à



ce que nous nous trouvions dans les limites indiquées. Nous ajoutons ensuite un excès de complexon III (0,5 ml de la solution à 5 % suffit largement), et enfin la solution de dithizone par portions de 2 ml environ, nous agitions vigoureusement à chaque addition pendant au moins une minute, jusqu'à obtention d'un léger excès de dithizone qui se traduit par la superposition de la coloration verte de la dithizone à celle orangée du dithizonate de mercure. Nous transférons la solution de tétrachlorure de carbone dans une ampoule à décantation de 100 ml (préalablement lavée avec une solution de dithizone pour enlever les traces de métaux), la solution à doser est encore épuisée par quelques ml de tétrachlorure de carbone pur. Puis nous ajoutons au tétrachlorure de carbone un volume égal de solution ammoniacale ; un excès de cette dernière entraînerait par agitation la formation d'une émulsion très difficile à détruire. Nous agitions vigoureusement, la solution de dithizonate devient orangée, la dithizone en excès passant en phase aqueuse. Une agitation suffisante rend la solution limpide ; elle est alors filtrée à travers un tampon de coton hydrophile dans un tube "pH Coleman" spécialement conçu pour lire au photocolorimètre et gradué à 20 ml. Nous complétons au trait de graduation avec du tétrachlorure de carbone pur et nous effectuons la lecture colorimétrique à la longueur d'onde de 500 m $\mu$ . Le résultat est reporté sur une courbe de référence.

Les courbes de référence sont effectuées à l'aide d'une solution de chlorure mercurique contenant 10  $\mu$ g de mercure par ml. Les résultats obtenus se trouvent consignés dans le tableau n° 3.

.../...



TABIEAU N° 3

Variation de la coloration du dithizonate de mercure en fonction  
de la concentration en mercure

| Mercure en µg | Densité optique (x 100) |      |      |
|---------------|-------------------------|------|------|
|               | Courbes N°              |      |      |
|               | 1                       | 2    | 3    |
| 0             | 5                       | 5    | 5    |
| 5             | 11,5                    | 12   | 12,5 |
| 10            | 19,5                    | 19,5 | 20,5 |
| 15            | 26,5                    | 27   | 28,5 |
| 20            | 33,5                    | 34   | 34,5 |
| 25            | 39,5                    | 40   | 41   |
| 30            | 45                      | 45   | 46,5 |
| 35            | 50                      | 50   |      |
| 40            | 54,5                    | 53   | 54,5 |

Le graphique N° 3 traduit les résultats obtenus avec la courbe N° 1.

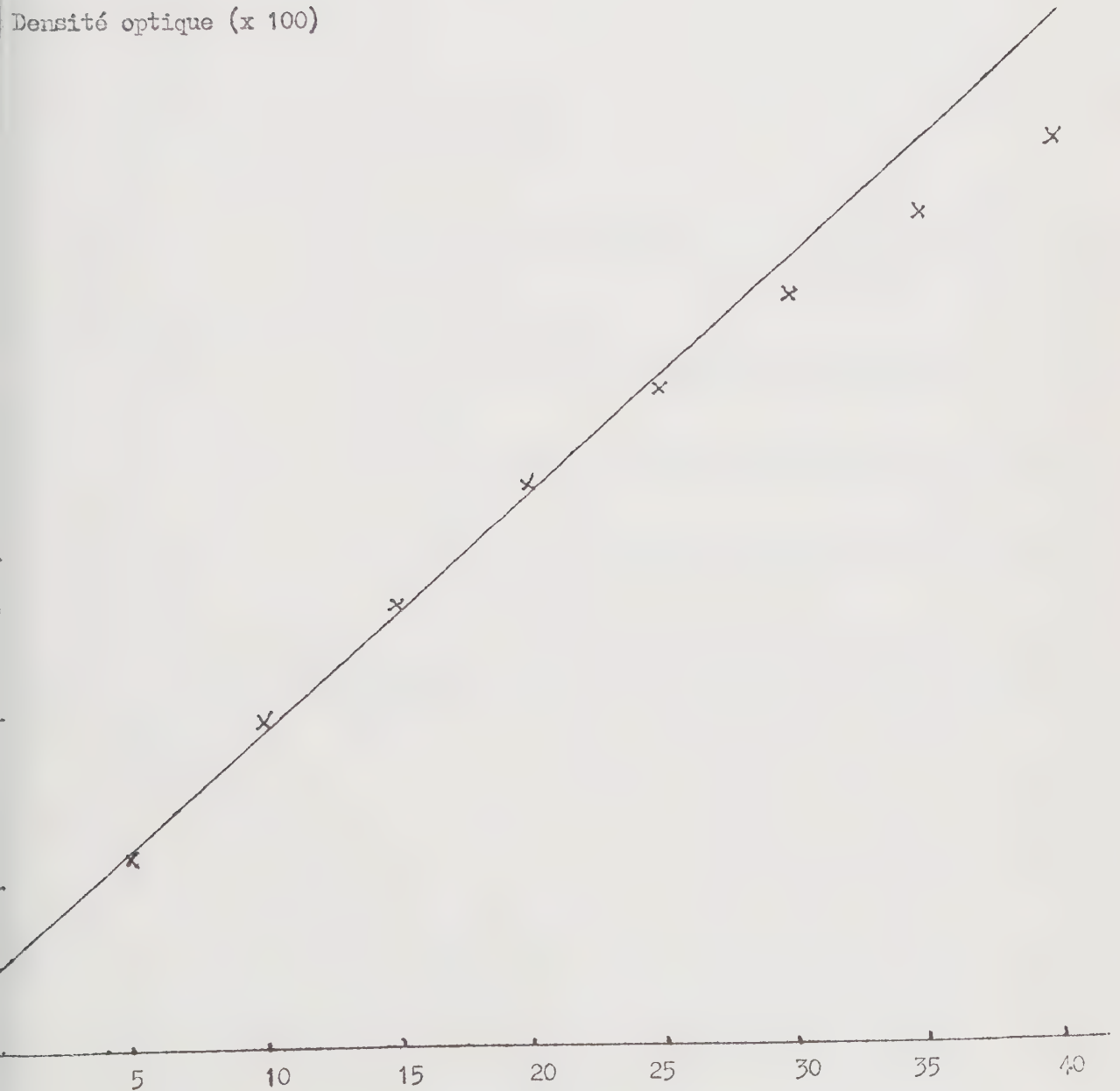
.../...



GRAPHIQUE N° 3

Courbe de référence (chiffres du Tableau N° 3, courbe n° 1)

Densité optique (x 100)



Mercure en  $\mu\text{g}$



Nous voyons que les droites obtenues s'infléchissent lorsque la quantité de mercure approche de 30  $\mu$ g mais la loi de Beer-Lambert est observée pour des teneurs de mercure comprises entre 5 et 25  $\mu$ g. C'est donc dans ces limites de concentration que nous effectuerons nos dosages. Néanmoins la pente de la droite représentative n'est pas rigoureusement constante d'un dosage à l'autre ; elle varie notamment avec le degré d'oxydation de la solution mère de dithizone, aussi avant chaque série de dosages, établissons-nous une courbe de référence.

### III - Justification de la méthode employée dans nos dosages.

Pour étudier la valeur des techniques utilisées, nous avons successivement minéralisé puis dosé :

- 1 - du chlorure mercurique en solution dans l'eau distillée.
- 2 - du chlorure mercurique en présence de milieu de culture.
- 3 - du chlorure mercurique en présence de levures de boulangerie.

Les résultats obtenus, c'est-à-dire les quantités de mercure retrouvé par rapport à celles mises en jeu, sont consignés dans le tableau n° 4.



TABLEAU N° 4

| Minéralisat                     | Mercure ajouté<br>en $\mu\text{g}$ | Mercure retrouvé<br>en $\mu\text{g}$ |
|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Chlorure mercurique en solution | 0                                  | 2,5                                  |
| dans l'eau distillée            | 0                                  | 3                                    |
|                                 | 200                                | 204                                  |
|                                 | 200                                | 206                                  |
|                                 | 200                                | 210                                  |
|                                 | 200                                | 214                                  |
| Chlorure mercurique en          | 0                                  | 0                                    |
| solution dans 20 ml de          | 100                                | 105                                  |
| milieu de culture               | 200                                | 204                                  |
| Chlorure mercurique             | 0                                  | 5,5                                  |
| additionné de 1 g de levure.    | 0                                  | 7,5                                  |
| de boulangerie fraîche.         | 100                                | 100                                  |
|                                 | 200                                | 200                                  |
|                                 | 200                                | 212                                  |
|                                 | 200                                | 214                                  |

Dans les essais témoins sans mercure, nous en retrouvons parfois quelques microgrammes, dus aux impuretés des réactifs, de la verrerie ou des milieux de cultures.

Nous voyons donc qu'il n'y a pas de perte de mercure par volatilisation au cours de la minéralisation et que l'on retrouve tout le mercure ajouté, l'erreur d'expérience est faible, parfaitement acceptable,



étant donné le but que nous nous sommes assigné.

B) - ETUDE DE LA REPARTITION DU MERCURE ENTRE LES LEVURES ET LE MILIEU DE CULTURE EN FIN DE CROISSANCE, PENETRATION DU MERCURE A L'INTERIEUR DES CELLULES.

On pouvait penser à priori que la résistance de *Candida utilis* au chlorure mercurique était en rapport avec la quantité de toxique que les cellules étaient capables de fixer par adsorption ou par pénétration. C'est pourquoi nous avons d'abord cherché à déterminer si du mercure est susceptible de se fixer sur les levures ou si ce métal reste intégralement dans le milieu de culture, à l'état non ionisé, lorsque la croissance est terminée ; nous nous sommes aussi demandé si la souche résistante et la souche normale présentent des propriétés identiques à ce point de vue. En effet, la résistance au mercure peut être le fait d'une imperméabilisation de la membrane empêchant l'accumulation de ce corps dans les germes.

I - Techniques utilisées.

Nous étudions la répartition du mercure sur des cultures en fin de croissance, c'est à dire qui atteignent une densité optique voisine ou supérieure à 120. Les cultures sont alors immédiatement centrifugées pendant 5 minutes à 6.000 tours par minute pour séparer le milieu des levures ; après décantation le culot est lavé 3 fois avec quelques ml d'eau distillée, ces eaux de lavage séparées par centrifugation sont ajoutées au milieu et le mercure est dosé, dans le milieu et dans les levures, selon les techniques décrites au paragraphe précédent.

II - Teneurs comparatives en mercure du milieu de culture et des levures

a) Croissance sur milieu additionné de jus de levure

En fin de croissance il ne subsiste plus de mercure ionisé



dans le milieu de culture mais seulement du mercure ne réagissant pas directement sur la dithizone ; cependant les levures ont fixé une partie importante du mercure initialement placé dans le milieu.

Nous avons vu page 18 , que la résistance de la levure au chlorure mercurique varie en fonction de la concentration du milieu de culture en jus de levure. Nos expériences ont été effectuées sur des milieux différents ; pour tenir compte de cette variation apparente de la résistance de la levure, nous avons, dans tous les cas, fait croître la levure normale et la levure résistante, sur la concentration maximum de chlorure mercurique qui permet une croissance normale de la souche résistante en 24 heures. La concentration initiale de chlorure mercurique varie de 500 à 800  $\mu\text{g}$  pour 100 ml et dans 3 essais elle est de 1.400  $\mu\text{g}$ , le milieu étant alors préparé avec un jus de levure plus concentré à partir de 35 g de levure de boulangerie pressée au lieu de 25 g.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans les tableaux N° 5 et 6. Les chiffres représentent les quantités de mercure retrouvé dans le milieu et dans la totalité des levures ; ils sont exprimés en pourcentage de la dose de mercure introduit initialement dans le milieu sous forme de chlorure mercurique.

Voir Tableau n° 5 page suivante.

.../...



TABLEAU N° 5

Répartition du mercure entre le milieu et la levure normale  
en fin croissance

| Essai N°   | Mercure % dans<br>le milieu | Mercure % fixé<br>par les levures | Mercure % retrouvé:<br>au total |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 1          | 16                          | 18,5                              | 34,5                            |
| 2          | 19                          | 20                                | 39                              |
| 3          | 27                          | 21,5                              | 48,5                            |
| 4          | 26                          | 23,5                              | 49,5                            |
| 5          | 28                          | 24                                | 52                              |
| 6          | 38                          | 18                                | 56                              |
| 7          | 32,5                        | 25,5                              | 58                              |
| 8          | 46,5                        | 15,5                              | 62                              |
| 9          | 35,5                        | 27                                | 62,5                            |
| 10         | 38,5                        | 24                                | 62,5                            |
| Total      | 307                         | 217,5                             | 524,5                           |
| Moyenne Mn | 30,7                        | 21,75                             | 52,45                           |

\*

\* \*



TABLEAU N° 6

Répartition du mercure entre le milieu et la levure résistante  
en fin de croissance

| Essai N°   | Mercure % dans le milieu | Mercure % fixé par les levures | Mercure % retrouvé au total |
|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1          | 18                       | 65                             | 83                          |
| 2          | 23                       | 61                             | 84                          |
| 3          | 31                       | 56                             | 87                          |
| 4          | 25,5                     | 61,5                           | 87                          |
| 5          | 16,5                     | 70,5                           | 87                          |
| 6          | 24                       | 65                             | 89                          |
| 7          | 19,5                     | 70,5                           | 90                          |
| 8          | 20,5                     | 71                             | 91,5                        |
| 9          | 38                       | 54                             | 92                          |
| 10         | 32                       | 60,5                           | 92,5                        |
| 11         | 21,5                     | 71,5                           | 93                          |
| 12         | 21                       | 74                             | 95                          |
| 13         | 43,5                     | 60                             | 103,5                       |
| Total      | 334,0                    | 840,5                          | 1.174,5                     |
| Moyenne Mr | 25,70                    | 64,65                          | 90,35                       |

b) Croissance sur milieu synthétique

La concentration initiale en chlorure mercurique est de  
350 µg pour 100 ml.



TABLEAU N° 7

Répartition du mercure entre le milieu et la levure

normale en fin de croissance.

| Essais N°  | Mercure % dans le milieu | Mercure % fixé par les levures | Mercure % retrouvé au total |
|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1          | 12                       | 55,5                           | 67,5                        |
| 2          | 5,5                      | 66,5                           | 72                          |
| 3          | 9,5                      | 67                             | 76,5                        |
| 4          | 9,5                      | 71,5                           | 81                          |
| 5          | 8,5                      | 74,5                           | 83                          |
| 6          | 15,5                     | 68,5                           | 84                          |
| Total      | 60,5                     | 403,5                          | 464                         |
| Moyenne Mn | 10,1                     | 67,2                           | 77,3                        |

TABLEAU N° 8

Répartition du mercure entre le milieu et la levure

résistante en fin de croissance

| Essais N°  | Mercure % dans le milieu | Mercure % fixé par les levures | Mercure % retrouvé au total |
|------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1          | 9                        | 85                             | 94                          |
| 2          | 14                       | 83                             | 97                          |
| 3          | 5,5                      | 98,5                           | 104                         |
| 4          | 4                        | 101                            | 105                         |
| 5          | 7,5                      | 100                            | 107,5                       |
| 6          | 8                        | 100                            | 108                         |
| Total      | 48,0                     | 567,5                          | 615,5                       |
| Moyenne Mr | 8                        | 94,6                           | 102,6                       |



Remarque :

Dans les tableaux, ci-avant, nous avons fait figurer le total du mercure retrouvé en fin de culture dans le milieu et dans les levures ; dans le cas de la levure normale ce total est nettement inférieur à celui du mercure mis en oeuvre. Nous avons étudié page 68 ce phénomène qui n'avait pas été sans beaucoup nous surprendre.

Afin de pouvoir tirer des conclusions probantes des tableaux précédents, nous avons cherché à donner une interprétation statistique des résultats obtenus. En effet, à partir des notions de moyenne arithmétique et de variance, il est possible de déterminer la probabilité pour que la différence constatée entre les résultats obtenus avec chacune des deux souches, ne soit pas due au hasard et par conséquent d'affirmer que Candida utilis, souche normale "n" et souche résistante "r" réagissent différemment quant au caractère étudié.

c) Analyse statistique des résultats

Nous nous sommes adressé à la méthode de comparaison des variances de deux échantillons (53) (44).

Nous avons calculé pour cela :

- Les moyennes arithmétiques de chaque série d'expériences, elles figurent dans les tableaux N° 4 et N° 5 : Mn pour la levure normale et Mr pour la levure résistante.

- l'écart entre chaque valeur trouvée et la moyenne

$$d_1, d_2, d_3 \dots \dots \dots d_x$$

- le carré des écarts :  $d_1^2, d_2^2, d_3^2 \dots \dots \dots d_x^2$

- la somme de ces carrés :  $\sum d_n^2$  et  $\sum d_r^2$



puis la variance de la moyenne pour chaque souche

$$V = \frac{\sum d^2}{n(n-1)}, \text{ n étant le nombre des essais dans chaque cas.}$$

- on effectue ensuite la somme de ces deux variances de moyennes ainsi calculées, et l'on prend la racine carrée de cette somme

$$\sigma_d = \sqrt{V_n + V_r}$$

- Connaissant par ailleurs la valeur de la différence des moyennes arithmétiques  $|D| = M_n - M_r$ , le calcul permet d'indiquer le pourcentage de chance (ou coefficient de sécurité) pour que les deux séries de valeurs soient significativement différentes.

En effet, si  $|D|$  est supérieur à  $1,96 \sigma_d$ , il y a au moins 95 chances sur 100 pour que les deux souches aient des comportements différents vis à vis du mercure.

Si  $|D|$  est supérieur à  $2,58 \sigma_d$ , la probabilité passe à 99 %

Si  $|D|$  est supérieur à  $3,30 \sigma_d$ , la probabilité passe à 99,9 %

I - Etude comparative du mercure restant dans le milieu de culture après croissance de la levure normale n et résistante r.

Sur milieu additionné de jus de levure ; les chiffres contenus dans les tableaux N° 5 et N° 6 permettent de calculer  $V_n$  et  $V_r$  :

$$V_n = 8,78 \text{ et } V_r = 5,10,$$

d'où

$$\sigma_d = 3,72 \text{ . } D = 30,7 - 25,7 = 5,0$$

On voit que  $D$  est inférieur à  $1,96 \sigma_d$  ( $5 < 7,4$ ).

Donc la différence n'est pas significative, le pourcentage du mercure initial demeurant dans le milieu de culture après croissance de la levure ne varie pas systématiquement suivant qu'il s'agit de la levure normale ou de la levure résistante.



Sur milieu synthétique, les chiffres contenus dans les tableaux N° 7 et N° 8 nous permettent de calculer :  $V_n$  et  $V_r$  :  $V_n = 1,91$ ,  
 $V_r = 1,98$

d'où

$$\sigma_d = 1,97 \text{ . } D = 10,1 - 8,0 = 2,1$$

On voit que  $D$  est inférieur à  $1,96 \sigma_d$  ( $2,1 < 3,86$ ), nous obtenons le même résultat qu'avec le milieu additionné de jus de levure, la différence n'est également pas significative.

II - Etude comparative du mercure fixé par les levures : souche normale et souche résistante.

Sur milieu additionné de jus de levure, les tableaux N° 5 et N° 6 nous donnent :

$$V_n = 1,35 \text{ et } V_r = 3,16$$

d'où

$$\sigma_d = 2,12 \text{ . } D = 64,65 - 21,75 = 42,90$$

On voit que  $D$  est supérieur à  $3,30 \sigma_d$  ( $42,90 > 7$ ).

Le pourcentage de mercure fixé par les levures varie donc de façon hautement significative entre la souche normale et la souche résistante.

Sur milieu synthétique, les tableaux N° 7 et N° 8 nous donnent  $V_n = 11,37$  ,  $V_r = 7,03$ ,

d'où

$$\sigma_d = 4,29 \text{ . } D = 94,6 - 67,2 = 27,4$$

On voit que  $D$  est supérieur à  $3,30 \sigma_d$  ( $27,4 > 14,16$ ).

Ici aussi, même interprétation que lorsque les levures croissent sur milieu additionné de jus de levure, la différence est hautement significative.



#### d) Conclusion

D'après l'étude statistique des résultats obtenus, nous voyons que la nature du milieu (additionné de jus de levure ou synthétique) n'influe pas qualitativement sur le comportement respectif de la souche normale et de la souche résistante, vis à vis de la répartition du mercure en fin de croissance.

Cependant, la quantité de mercure qui reste en fin de croissance dans le milieu synthétique est très faible, de l'ordre de 10 %, contre 30 % dans le milieu additionné de jus de levure, ce qui s'explique par le fait que le jus de levure apporte des composés susceptibles de se combiner avec l'ion mercurique, et donc de le maintenir dans le milieu au cours de la croissance.

Mais le résultat que notre étude statistique permet d'établir le plus nettement est sans aucun doute la différence hautement significative existant entre la levure normale et la levure résistante quant à la fixation du mercure.

La souche résistante fixe 94,6 % du mercure initial en milieu synthétique et 64,6 % en milieu additionné de jus de levure. La souche normale fixe 67,2 % du mercure initial en milieu synthétique et 21,7 % en milieu additionné de jus de levure.

Si nous rapportons nos résultats, non plus aux pourcentages du mercure initial, mais à la quantité de mercure placé primitivement dans le milieu, les résultats diffèrent quelque peu. En effet, la levure pousse en milieu additionné de jus de levure sur une concentration de chlorure mercurique voisine de 750  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu et sur 350  $\mu$ g en milieu synthétique, ce qui correspond à des quantités de mercure fixé par les levures contenues dans 100 ml de milieu, consignées dans le tableau N° 9.







saturées d'abord avec des ions mercuriques et traitées ensuite avec l'acide sulfhydrique présentent alors des cristaux intracellulaires qui ont été identifiés par diffraction des rayons X comme étant du sulfure mercurique, Ces résultats suggèrent qu'une partie du mercure au moins est passée à l'intérieur des cellules.

BENIGNO et SAINTI (9) paraissent être arrivés à une conclusion du même ordre par autolyse d'hématies de poulet, traitées au préalable par le chlorure mercurique, et étude du mercure fixé sur les noyaux. Néanmoins, vu les difficultés techniques d'une telle démonstration directe, aucune preuve formelle n'a pu être dégagée de leurs travaux.

Nous nous sommes trouvé devant les mêmes difficultés que nos prédécesseurs : au cours du broyage il est possible qu'une partie du mercure fixé sur les membranes puisse s'en détacher et se mélanger au suc cellulaire et inversement il n'est pas absolument exclu que le mercure du suc cellulaire soit susceptible de se fixer sur les membranes libérées par le broyage.

#### a) Techniques utilisées

Les levures en suspension aqueuse sont broyées par agitation avec de très petites billes de verre appelées "Ballotini" ou "Globeads" qui nous ont été fournies par "Englass" Leicester, Angleterre, ces billes de verre sont au préalable lavées au mélange sulfochromique et rincées à l'eau distillée (31) (36).

Le broyage est obtenu par un appareil du type "Virtis homogenizer" (42) que nous avons fait réaliser à Nancy\*. L'agitation est obtenue par un arbre excentrique qui tourne entre deux bras supportant des cuves cylindriques en teflon, ces deux bras sont ramenés à leur position initiale par un puissant ressort. La vitesse de rotation de l'arbre est de 2.800 tours par minute et l'amplitude maxima de déplacement des cuves est de 8 mm. Les cuves d'un diamètre intérieur de 18 mm et d'une hauteur

\* (Chaix, constructeur, Avenue Hilton, Nancy).



de 44 mm sont munies d'un très long pas de vis pour éviter les fuites au cours de l'agitation.

b) Marche d'un essai

Les levures, recueillies par centrifugation, d'une culture faite sur 20 ou 40 ml de milieu additionné de jus de levure, sont lavées à trois reprises avec de l'eau distillée et le dernier culot est transféré dans une des cuves du broyeur à l'aide d'un égal volume d'eau, environ 0,3 ml. Nous ajoutons alors à cette suspension un poids égal de billes de verre (31) et nous faisons fonctionner l'appareil pendant 30 minutes.

Nous employons la technique indiquée par SLONIMSKI (55) pour séparer le suc cellulaire des membranes, technique que nous avons légèrement modifiée par suite de la nature du microorganisme étudié et de la centrifugeuse utilisée (Centrifugeuse réfrigérée JOUAN, type C 53).

Le broyat est repris par le minimum d'eau et décanté, nous éliminons ainsi les billes de verre qui sont ensuite lavées deux fois avec quelques ml d'eau, puis nous soumettons la suspension à une première centrifugation à 2.500 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot contient toutes les cellules encore intactes et des membranes, le liquide surnageant exempt de cellules intactes est centrifugé une deuxième fois à 5.000 tours par minute pendant 10 minutes : le culot comprend des membranes et des particules intra-cellulaires denses, le liquide surnageant exempt de membrane est constitué de suc cellulaire dilué.

Nous contrôlons chaque expérience par un examen microscopique. La solution de Lugol permet de différencier aisément les cellules intactes, qui seules se colorent, des membranes, facilement reconnaissables par leur aspect réfringent et leur double paroi nettement visible. La difficulté d'exécution de ces diverses opérations et l'imperfection du broyage doivent nous rendre circonspects dans l'interprétation des résultats quantitatifs.



Une première expérience faite avec la levure résistante nous montre la présence de mercure dans le suc cellulaire.

TABIEAU N° 10

| Essai N° | Concentration initiale en chlorure mercurique, mg pour 100 ml. | Mercure % fixé par les levures | Mercure % retrouvé dans le suc cellulaire |
|----------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|
| 1        | 0,70                                                           |                                | 22,1                                      |
| 2        | 0,70                                                           |                                | 39,3                                      |
| 3        | 1,5                                                            | 54,6                           | 16,3                                      |

Nous avons alors effectué des essais systématiques (voir tableau N° 11) en dosant le mercure se trouvant dans chaque fraction du broyage de la levure résistante, croissant sur milieu préparé avec un jus de levure à 35 g pour 1.000 de levure de boulangerie.

TABIEAU N° 11

|   | Concentration initiale en chlorure mercurique mg pour 100 ml. (1) | Mercure % fixé par les levures. (2) | Mercure % retrouvé dans le culot de la 1ère centrifugation (3) | Mercure % retrouvé dans le jus cellulaire (4) | Mercure % retrouvé dans le culot de la 2ème centrifugation (5) | Mercure % retrouvé au total. (6) |
|---|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1,5                                                               | 53,3                                | 28,5                                                           | 15,8                                          | 9,3                                                            | 53,6                             |
| 2 | 1,5                                                               | 53,3                                | 23,3                                                           | 20,6                                          | 6,5                                                            | 50,4                             |

Les valeurs trouvées dans les colonnes (2) et (6) devraient être identiques, la concordance est satisfaisante.



c) Discussion :

Les résultats consignés dans le tableau N° 12 ne laissent guère de place au doute. La présence de mercure dans le suc cellulaire paraît certaine. Il est en effet, difficile d'admettre que la notable proportion de mercure retrouvé provienne du mercure adsorbé sur les membranes sous forme d'un composé insoluble, qui se détacherait comme des pellicules sous l'influence du broyage ; rien ne permet de le supposer.

La fixation relativement peu importante du mercure par les membranes nous a surpris. Il est vrai que, si le 2ème culot de centrifugation est principalement formé de membranes, ces dernières n'y sont pas rassemblées en totalité, une partie d'entre elles se trouvant avec les cellules encore intactes dans le 1er culot de centrifugation.

Nous avons voulu nous rendre compte si les membranes ne possédaient qu'un faible pouvoir de fixation du mercure et nous avons institué l'expérience suivante :

la fraction riche en débris de membranes (culot de la 2ème centrifugation d'une levure normale cultivée sur 100 ml de milieu) a été lavée 3 fois à l'eau distillée, puis les membranes ont été mises en suspension, pendant 24 heures, dans 25 ml d'eau distillée contenant 500  $\mu$ g de chlorure mercurique. Le mercure fixé par les membranes après lavage à l'eau distillée a été trouvé voisin de 75 %.

Malgré le faible pourcentage de membranes recueillies, nous pensons qu'in vitro les membranes de levure sont susceptibles de fixer beaucoup plus de mercure qu'in vivo. Quoiqu'il en soit le mercure retrouvé sur les débris de membrane des levures cultivées en présence de chlorure mercurique n'est pas dû à un artefact.

d) Conclusion

Une levure cultivée sur chlorure mercurique fixe une petite proportion de mercure sur sa membrane et se laisse pénétrer par une proportion plus importante qui passe dans le suc cellulaire.



c) - ETUDE CINETIQUE DE L'IONISATION DU MERCURE DANS LE MILIEU ET DE SA  
FIXATION PAR LES LEVURES AU COURS DE LEUR DEVELOPPEMENT.

I - Ionisation du mercure et croissance de la levure sur milieu additionné de jus de levure.

Des expériences préliminaires nous ayant montré que l'ionisation du chlorure mercurique diminuait progressivement au cours de la phase de latence présentée par la levure cultivée en sa présence ; nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas une relation de cause à effet et si la chute du mercure ionisé en dessous d'un certain niveau n'était pas nécessaire pour que commence la croissance bactérienne ?

Nous avons donc été amené à confronter la concentration en ions mercuriques subsistant dans le milieu de culture contenant des levures avec la densité optique de ce même milieu.

a) Techniques utilisées pour le dosage du mercure ionisé.

Nous dosons le mercure suivant notre technique habituelle appliquée directement sur le milieu de culture sans minéralisation préalable.

En réalité, il n'est pas sûr que la dithizone ne nous donne que l'ion mercurique ; s'il est improbable que du mercure en combinaison organique non ionisée puisse être dosé par la dithizone qui ne réagit qu'avec les ions métalliques, par contre, le mercure à l'état mercurieux peut donner le même dithizonate (16), ce que nous avons vérifié expérimentalement, mais les sels mercurieux donnent un précipité lorsqu'on ajoute la solution de complexon III et ne devraient donc pas interférer, s'il en existait dans nos essais.

Au cours du dosage, le milieu de culture et les levures forment une émulsion avec le solvant organique. Pour réduire cet inconvénient, nous effectuons le dosage sur une prise d'essai, centrifugée au



préalable pour éliminer les levures et dont le volume est inférieur ou égal à 3 ml ; en effet, plus le volume de la prise d'essai est grand, plus l'émulsion est importante et difficile à détruire entièrement. Ces deux éléments, faible volume de la prise d'essai et présence d'émulsions, diminuent la précision des résultats. Sur des cultures d'un volume de 100 ml nous effectuons des prélèvements stériles à intervalles de temps réguliers ; ces prises d'essai sont immédiatement centrifugées et le dosage de l'ion mercurique est effectué sur 1 à 3 ml du liquide surnageant.

### b) Résultats

Toutes nos déterminations effectuées sur milieu additionné de jus de levure ont été concordantes, en voici quelques exemples :

#### 1) Levure normaleensemencée en présence de chlorure mercurique.

TABLÉAU N° 12

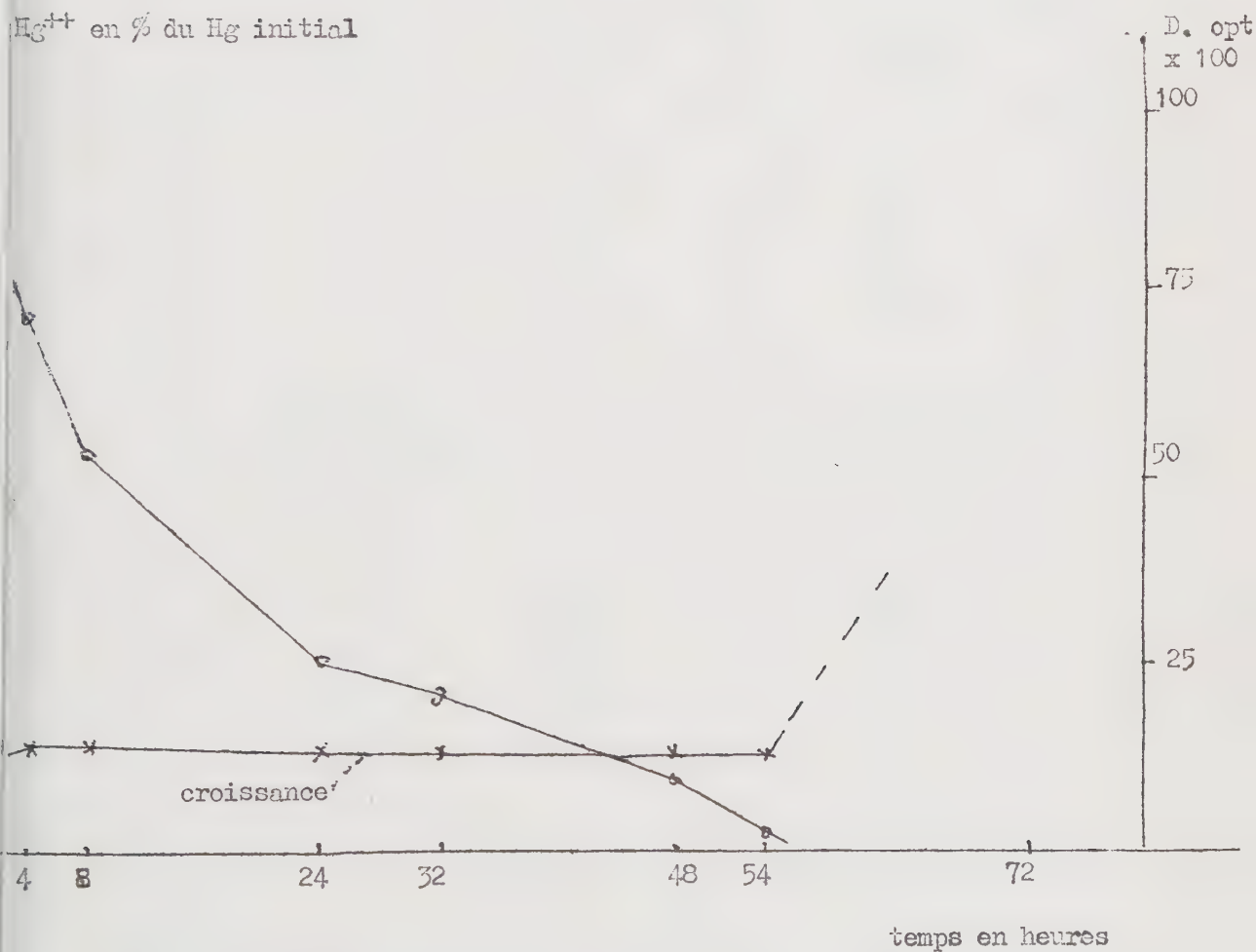
| Expérience N°1                                     |                         |                                       | Expérience N°2                                     |                         |                                       |
|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Concentration initiale du $\text{Cl}_2\text{Hg}$ : |                         |                                       | Concentration initiale du $\text{Cl}_2\text{Hg}$ : |                         |                                       |
| 700 $\mu\text{g}$ pour 100 ml.                     |                         |                                       | 750 $\mu\text{g}$ pour 100 ml.                     |                         |                                       |
| Temps en heures                                    | Densité optique (x 100) | $\text{Hg}^{++}$ % du mercure initial | Temps en heures                                    | Densité optique (x 100) | $\text{Hg}^{++}$ % du mercure initial |
| 0                                                  | 12                      | 96,4                                  | 0                                                  | 13,5                    | 107,3                                 |
| 4                                                  | 14                      | 71,4                                  | 4                                                  | 14,5                    | 68,4                                  |
| 8                                                  | 14                      | 53,6                                  | 8                                                  | 14,5                    | 52,1                                  |
| 24                                                 | 13                      | 25                                    | 24                                                 | 14                      | 36                                    |
| 32                                                 | 13                      | 20,6                                  | 48                                                 | 21                      | 0                                     |
| 48                                                 | 13                      | 9,7                                   | 72                                                 | 121                     | 0                                     |
| 54                                                 | 13                      | traces                                |                                                    |                         |                                       |
| 72                                                 | 125                     | 0                                     |                                                    |                         |                                       |

Nous voyons que la croissance ne devient appréciable que lorsque le mercure ionisé a presque totalement disparu du milieu. Le graphique N° 4 schématise les résultats de l'expérience N° 1.



GRAPHIQUE N° 4

Ionisation du mercure du milieu de culture et croissance de la  
levure normale.





2) Levure résistante ensemencée en présence de chlorure mercurique.

TABEAU N° 13

| Expérience N° 3                                                       |                               |                                             | Expérience N° 4                                                        |                               |                                             |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| Concentration initiale du Cl <sub>2</sub> Hg :<br>500 µg pour 100 ml. |                               |                                             | Concentration initiale du Cl <sub>2</sub> Hg :<br>400 µg pour 100 ml.  |                               |                                             |
| Temps<br>en<br>heures                                                 | Densité<br>optique<br>(x 100) | Hg <sup>++</sup> % du<br>mercure<br>initial | Temps<br>en<br>heures                                                  | Densité<br>optique<br>(x 100) | Hg <sup>++</sup> % du<br>mercure<br>initial |
| 0                                                                     | 10,8                          | 99,4                                        | 0                                                                      | 10                            | 101,2                                       |
| 2                                                                     | 11,5                          | 59,4                                        | 2                                                                      | 11                            | 59,5                                        |
| 4                                                                     | 12                            | 48,6                                        | 4                                                                      | 11,5                          | 40,5                                        |
| 6                                                                     | 12                            | 37,8                                        | 6                                                                      | 12,2                          | 37,7                                        |
| 8                                                                     | 12                            | 27                                          | 8                                                                      | 13,2                          | traces                                      |
|                                                                       |                               |                                             | 10                                                                     | 15                            | 0                                           |
| Expérience N° 5                                                       |                               |                                             | Expérience N° 6                                                        |                               |                                             |
| Concentration initiale du Cl <sub>2</sub> Hg :<br>750 µg pour 100 ml  |                               |                                             | Concentration initiale du Cl <sub>2</sub> Hg :<br>1.250 µg pour 100 ml |                               |                                             |
| 0                                                                     | 11,5                          | 105,3                                       | 0                                                                      | 12,5                          | 108                                         |
| 1                                                                     | 12                            | 84,6                                        | 1                                                                      | 13                            | 85,2                                        |
| 2                                                                     | 13                            | 58                                          | 2                                                                      | 14                            | 69,7                                        |
| 3                                                                     | 13,5                          | 45,6                                        | 3                                                                      | 16                            | 50,8                                        |
| 5                                                                     | 14,5                          | 37,2                                        | 5                                                                      | 19                            | 31,3                                        |
| 7                                                                     | 16                            | 18                                          | 7                                                                      | 24                            | 19,4                                        |
| 9                                                                     | 20                            | 4,5                                         | 9                                                                      | 34                            | 0                                           |
| 10                                                                    | 22,5                          | 0                                           | 10                                                                     | 47,5                          | 0                                           |

Remarque :

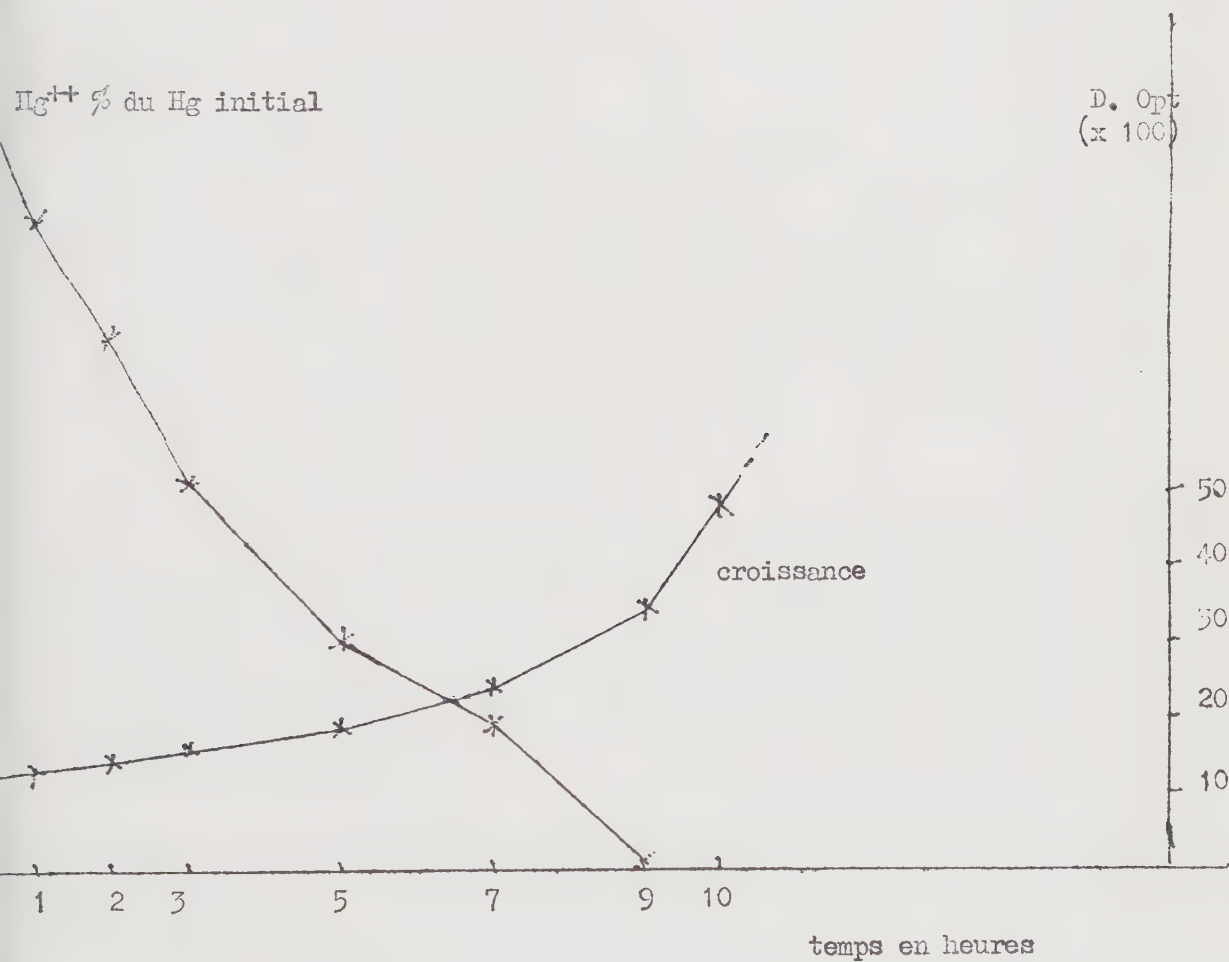
La concentration relativement forte de chlorure mercurique employé dans l'expérience N° 6 a permis une croissance normale parce que la concentration du milieu en jus de levure était plus forte, le jus de levure étant préparé à partir de 35 g de levure de boulangerie pressée au lieu de 25 g.

Le graphique N° 5 schématise les résultats de l'expérience N° 6.



GRAPHIQUE N° 5

Ionisation du mercure du milieu de culture et croissance de la levure  
résistante





On voit qu'avec la levure résistante, la croissance débute lorsqu'il subsiste encore un pourcentage notable de mercure ionisé dosable par la dithizone, cette remarque est valable pour toutes les expériences.

Dans les deux cas, levure résistante et levure normale, la disparition du mercure ionisé est progressive à vitesse décroissante en fonction du temps.

Mais dans le cas de la levure résistante, le mercure ionisé disparaît beaucoup plus vite, c'est ainsi que pour une même quantité de chlorure mercurique additionné au milieu de culture : 750  $\mu$ g pour 100 ml, la disparition de la première moitié du mercure ionisé a lieu au bout de 9 heures dans le cas de la levure normale et en moins de 3 heures avec la levure résistante, quant à la deuxième moitié du mercure ionisé, elle disparaît en presque totalité 3 fois plus lentement que la première partie dans le cas de la levure résistante, et 5 fois plus lentement avec la levure normale ; ce qui semble indiquer que l'allure du phénomène est de même nature.

### c) Conclusion.

La condition pour que la levure résistante et la levure normale puissent se développer sur un milieu additionné de chlorure mercurique, semble être que les ions mercuriques disparaissent en grande partie du milieu ; cela se réalise beaucoup plus rapidement avec la souche résistante qu'avec la souche normale.

## II - Fixation du mercure par la levure au cours de son développement sur milieu additionné de jus de levure.

Nous venons de voir que la levure ne commence à proliférer nettement que lorsque la plus grande partie du mercure ionisé a disparu du milieu ; nous avons également montré qu'en fin de croissance, la levure a fixé une quantité importante du mercure. C'est pourquoi il nous a paru



intéressant de suivre la fixation du mercure par la levure au cours de sa croissance.

On peut en effet imaginer que l'inoculum fixe tout le mercure qui ne se retrouve pas sous forme de mercure ionisé dans le milieu, et que les levures des générations successives n'ont plus la possibilité de fixer le mercure qui a été éliminé du milieu, au moins en majeure partie, par les levures initiales ; néanmoins cette hypothèse se heurte au fait que la fixation d'une quantité relativement forte de mercure serait toxique pour la levure. Il semble donc plus probable que la levure commence à se développer dans un milieu encore relativement riche en mercure mais que ce mercure ne serait plus décelable par la dithizone, c'est à dire à l'état non ionisé ; les nouvelles cellules de levure qui apparaissent déplaceraient le mercure du milieu de ses combinaisons organiques pour le fixer, soit par adsorption soit par combinaison chimique. C'est pourquoi sur une même culture, nous avons étudié parallèlement :

- 1 - la désionisation du mercure
- 2 - La fixation du mercure par les levures
- 3 - Le mercure total restant dans le milieu, c'est à dire, mercure ionisé + mercure éventuellement à l'état non ionisé.

Pour réaliser ces expériences, nous effectuons des prélèvements stériles à intervalles de temps déterminés sur une culture d'un volume de 100 ml, comme pour le dosage du mercure ionisé, mais les prises d'essai sont plus importantes. Après avoir rendu le milieu homogène par agitation, nous prélevons un volume de 4 à 7 ml que nous centrifugeons ; le culot lavé 2 fois avec de l'eau distillée est minéralisé et nous y dosons le mercure qui a été fixé par les levures. Le liquide surnageant est divisé en deux parties, sur la première nous dosons directement le mercure ionisé par la dithizone, la deuxième partie est minéralisée et le mercure total du milieu y est dosé, également par la dithizone.

Les résultats sont exprimés en pourcentage du mercure initial



mis en jeu.

Nous allons exposer successivement les résultats obtenus avec la levure normale et avec la levure résistante.

- 1) - Levure normaleensemencée en présence de chlorure mercurique. (à la concentration initiale de 750  $\mu$ g pour 100 ml).

TABLÉAU N° 14

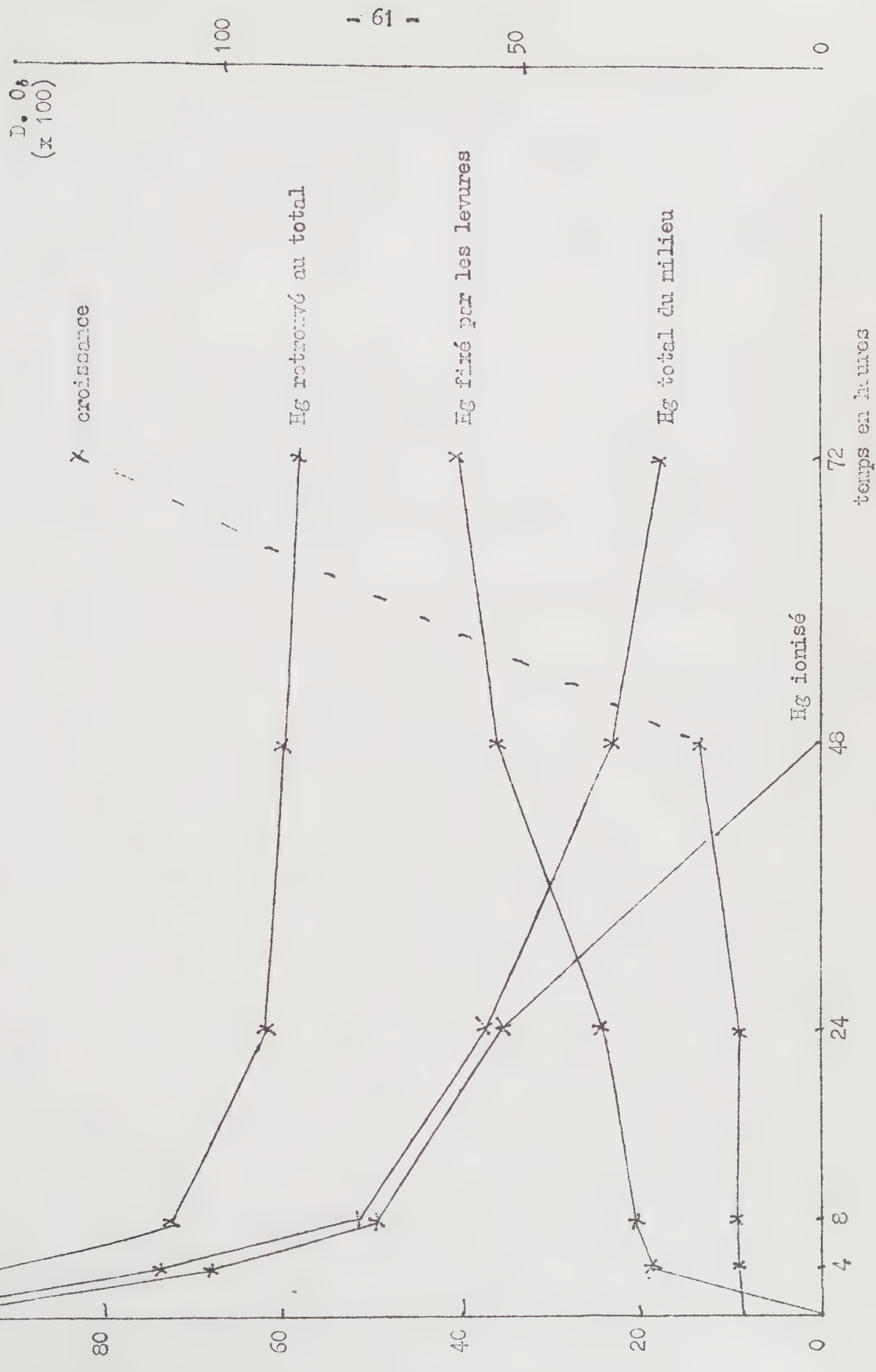
| Expérience N° 1 |                         |                                     |                            |                                 |                                |                             |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Temps en heures | Densité optique (x 100) | Mercuré % dosé après minéralisation | Mercuré % dosé directement | Mercuré non dosable directement | Mercuré % fixé par les levures | Mercuré % retrouvé au total |
|                 | (1)                     | (2)                                 | (3)                        | (2) - (3)                       | (5)                            | (6)                         |
| 0               | 13,5                    | -                                   | 107,3                      | -                               | -                              | 107,3                       |
| 4               | 14,5                    | 74,4                                | 68,4                       | 6                               | 19,3                           | 93,7                        |
| 8               | 14,5                    | 50                                  | 52,1                       | 2,1                             | 21                             | 73,1                        |
| 24              | 14                      | 37,7                                | 36                         | 1,7                             | 24,9                           | 62,6                        |
| 48              | 21                      | 23,7                                | 0                          | 23,7                            | 36,8                           | 60,5                        |
| 72              | 125                     | 18                                  | 0                          | 18                              | 41                             | 59                          |
| Expérience N° 2 |                         |                                     |                            |                                 |                                |                             |
| 0               | 12                      | -                                   | 103,7                      | -                               | -                              | 103,7                       |
| 4               | 13                      | 69                                  | 66,6                       | 2,4                             | 20,8                           | 89,8                        |
| 8               | 13                      | 54                                  | 54                         | 0                               | 21,9                           | 75,9                        |
| 24              | 13                      | 40,8                                | 37,7                       | 3,1                             | 24,9                           | 65,7                        |
| 48              | 13                      | 22,8                                | 13,7                       | 9,1                             | 31,9                           | 54,7                        |
| 72              | 120                     | 20                                  | 0                          | 20                              | 34,9                           | 54,9                        |

Le graphique N° 6 schématise les résultats de l'expérience N°1



Hg % du Hg initial

centration maximum de chlorure mercurique permettant  
une croissance normale de la levure résistante.





La levure fixe d'abord une proportion importante du mercure, en effet alors qu'aucune croissance n'est décelable, plus de 25 % du mercure initial est fixé. Les cellules nouvelles fixeront bien encore de petites quantités de mercure (10 à 16 %) mais chaque cellule nouvelle sera donc bien moins riche en mercure que ne l'étaient devenues les cellules de l'inoculum.

Le mercure fixé alors ne provient plus du mercure ionisé mais du mercure non dosable directement par la dithizone et qui se trouve en combinaison organique relativement stable, la levure est donc capable de l'adsorber ou de le cataboliser ou encore de le déplacer grâce à un groupement fonctionnel approprié (par exemple un groupement -SH).

Lorsque la croissance a lieu, elle est aussi rapide et aussi complète qu'en absence de sel mercurique.

2) - Levure résistante ensemencée en présence de chlorure mercurique.

(à la concentration initiale de 750 µg pour 100 ml)

voir Tableau N° 15 page suivante



TABEAU N° 15

| Expérience N° 1   |                         |                                     |                            |                                           |                                |                             |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Milieu de culture |                         |                                     |                            |                                           |                                |                             |
| Temps en heures   | Densité optique (x 100) | Mercuré % dosé après minéralisation | Mercuré % dosé directement | Mercuré non dosable directement (2) - (3) | Mercuré % fixé par les levures | Mercuré % retrouvé au total |
| (1)               | (2)                     | (3)                                 | (4)                        | (5)                                       | (6)                            | (7)                         |
| 0                 | 12                      | -                                   | 103,2                      | -                                         | -                              | 103,2                       |
| 2                 | 13,5                    | 64,0                                | 51,5                       | 12,5                                      | 40,0                           | 104,0                       |
| 4                 | 15                      | 48,0                                | 38,8                       | 9,2                                       | 57,6                           | 105,6                       |
| 6                 | 17                      | 38,4                                | 24,0                       | 14,4                                      | 60,8                           | 99,2                        |
| 8                 | 24,5                    | 23,3                                | 0                          | 23,3                                      | 71,3                           | 94,6                        |
| 24                | 130                     | 8,0                                 | 0                          | 8,0                                       | 87,5                           | 95,5                        |

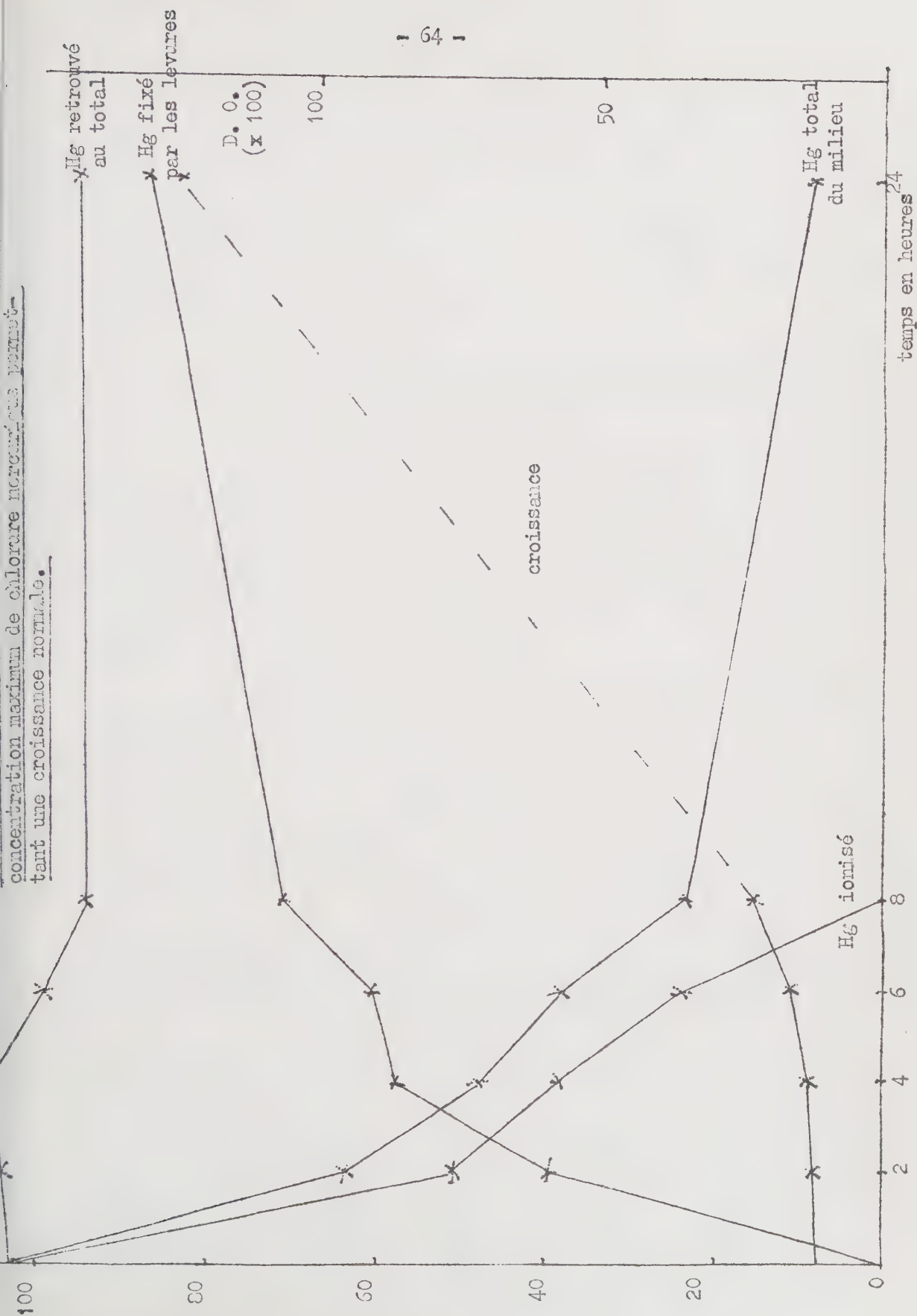
| Expérience N° 2   |                         |                                     |                            |                                           |                                |                             |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Milieu de culture |                         |                                     |                            |                                           |                                |                             |
| Temps en heures   | Densité optique (x 100) | Mercuré % dosé après minéralisation | Mercuré % dosé directement | Mercuré non dosable directement (2) - (3) | Mercuré % fixé par les levures | Mercuré % retrouvé au total |
| (1)               | (2)                     | (3)                                 | (4)                        | (5)                                       | (6)                            | (7)                         |
| 0                 | 12                      | -                                   | 108                        | -                                         | -                              | 108                         |
| 2                 | 13                      | 66,6                                | 60                         | 6,6                                       | 42                             | 100,6                       |
| 4                 | 14                      | 47,5                                | 43,2                       | 4,3                                       | 63,2                           | 110,7                       |
| 6                 | 16,5                    | 30                                  | 19,2                       | 10,8                                      | 61,5                           | 91,5                        |
| 8                 | 23                      | 22,8                                | 0                          | 22,8                                      | 71,3                           | 94,1                        |
| 24                | 125                     | 14,9                                | 0                          | 14,9                                      | 77,5                           | 92,4                        |

Le graphique N° 7 schématise les résultats de l'expérience N° 1.



concentration maximum de chlorure mercureux par rapport  
à une croissance normale.

- 64 -





La fixation du mercure par la levure résistante est bien plus rapide que par la levure normale, plus de 55 % en 4 heures, contre moins de 21 %. Dans le même temps chaque cellule de levure a fixé une quantité relativement importante de mercure et les cellules nouvelles qui tirent le mercure surtout des composés organiques non décelables directement par la dithizone n'en ont plus beaucoup à leur disposition.

3) - Levure résistanteensemencée en présence d'une plus forte concentration de chlorure mercurique.

Ces raisons nous ont poussé à nous demander ce qui se passerait si on offrait à la levure résistante une quantité de mercure supérieure à celle qui lui permet une croissance encore normale. Nous avons placé dans le milieu de culture 1,500  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml au lieu de 750  $\mu$ g et nous avons suivi comme précédemment le sort du mercure en même temps que le développement de la levure.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau N° 16 et schématisés sur le graphique N° 8.

TABLÉAU N° 16

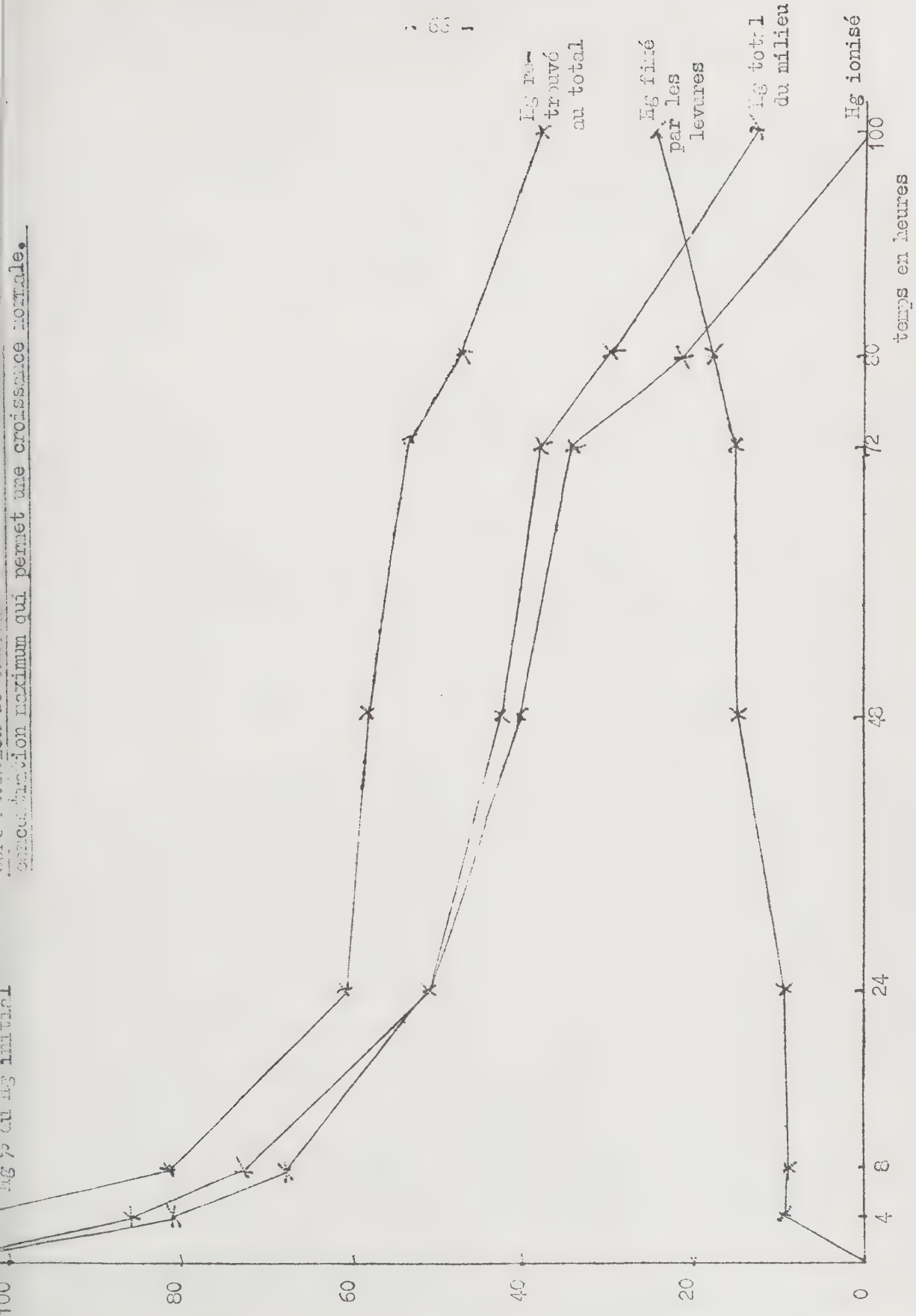
Concentration initiale du chlorure mercurique : 1,500  $\mu$ g pour 100 ml.

|         |          | Milieu de culture |       |              |        |              |            |
|---------|----------|-------------------|-------|--------------|--------|--------------|------------|
| Temps:  | Densité: | Mercure %         |       | Mercure %    |        | Mercure %    | Mercure %: |
| en :    | optique: | dosé après        |       | dosé di-     |        | fixé par :   | retrouvé:  |
| heures: | (x 100): | minéralisa-       |       | rectement :  |        | les levures: | au total : |
|         |          | tion              |       | directement: |        |              |            |
|         |          | (2)               | (5)   | (2)          | (4)(5) | (5)          | (6)        |
| 0       | 12       | -                 | 109,1 | -            | -      | -            | 109,1      |
| 4       | 14       | 86,4              | 81,6  | 4,8          | 9,5    | 105,9        |            |
| 8       | 14       | 73,2              | 68,4  | 4,8          | 9      | 82,2         |            |
| 24      | 14       | 51,6              | 51,6  | 0            | 9,5    | 61,1         |            |
| 48      | 14       | 43,2              | 40,8  | 2,4          | 15,5   | 58,7         |            |
| 72      | 14       | 38,4              | 34,8  | 3,6          | 15,5   | 53,9         |            |
| 80      | 14       | 30                | 21,6  | 8,4          | 18     | 48           |            |
| 100     | 120      | 12,9              | 0     | 12,9         | 25,3   | 38,2         |            |



croissance normale.

Hg<sup>2+</sup> au Hg initial





Nous voyons que d'après l'étude du graphique, la levure résistante placée sur une concentration initiale de chlorure mercurique double de celle qu'elle peut supporter en présentant un développement normal, se comporte comme une levure non résistante : le temps de latence augmente et le pourcentage du mercure fixé reste faible (25 % en fin de croissance).

Dans une première phase, une partie du mercure disparaît du milieu et le mercure restant est presque entièrement ionisé. Le mercure fixé par la levure est peu abondant. Si nous comparons, à la 8ème heure, des levures résistantes placées respectivement sur 750 et 1.500  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu, nous voyons que la levure placée sur 750  $\mu$ g de chlorure mercurique en a fixé plus de 60 % ; il ne subsiste plus guère de mercure dans le milieu et la croissance débute, alors qu'au même moment, la levure placée sur 1.500  $\mu$ g de chlorure mercurique n'en a fixé que 10 %, (soit trois fois moins de mercure que dans le cas précédent), et qu'il subsiste encore dans le milieu 66 % du mercure initial .

La fixation du mercure par la levure paraît donc ne pas être un phénomène passif mais un phénomène dépendant de son métabolisme de repos. La présence d'une quantité plus forte de mercure (1.500  $\mu$ g au lieu de 750  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml) ralentit le métabolisme et diminue la fixation du métal. Dans une deuxième phase qui dure environ trois jours, les mêmes phénomènes que ceux décrits dans la première phase continuent à se dérouler, mais au ralenti : la levure continue à fixer du mercure et il en disparaît encore un peu du milieu. Il semble qu'à un moment donné la concentration du milieu en mercure ionisé est devenue assez faible pour permettre à la levure de reprendre un comportement normal. Ceci constitue la troisième phase, la phase de croissance logarithmique au cours de laquelle le mercure ionisé achève de disparaître et où la levure se développe au même rythme et jusqu'au même point que la levure normale.

#### Conclusion de l'étude cinétique

Une levure, placée dans un milieu additionné de jus de



levure contenant du chlorure mercurique, fixe progressivement du mercure en même temps qu'une proportion notable de ce métal disparaît du milieu ; il s'agit d'un processus actif qui se ralentit lorsqu'on augmente la concentration en mercure. La levure résistante se différencie de la levure normale par une fixation beaucoup plus rapide. Lorsque le mercure ionisé a presque totalement disparu du milieu, la division cellulaire commence, la croissance est alors aussi rapide et complète que celle d'une levure normale cultivée en l'absence du toxique.

D) - FORMATION D'UN COMPOSE MERCURIEL VOLATIL

Des valeurs moyennes rapportées précédemment aux sous-chapitres B et C, il résulte que :

1°) - Lorsque la levure résistante est cultivée en présence de chlorure mercurique, tout le mercure placé dans le milieu de culture au début de l'expérience est retrouvé lorsque la pousse a eu lieu sur milieu synthétique, alors qu'on note un déficit appréciable (10 % en moyenne) s'il s'agit du milieu additionné de jus de levure.

2°) - Au contraire, avec la levure normale dont le développement en présence de mercure est fortement différé, le mercure recouvré est très inférieur au mercure initial ; en moyenne 77 % seulement du mercure est retrouvé, lorsque la culture a achevé sa croissance sur milieu synthétique, et 52,5 % sur milieu additionné de jus de levure.

Les différences sont constantes et beaucoup trop élevées pour pouvoir être attribuées à des erreurs d'expériences ; force était donc d'admettre la formation de composés mercuriels volatils, d'autant que nous avons remarqué que plus le temps de latence est élevé, plus le pourcentage de mercure recouvré est faible par rapport au mercure mis en jeu.

Un exemple est donné dans le tableau N° 17.



TABIEAU N° 17

Mercurc retrouvé en fonction du temps de latence

| Concentration<br>initiale de<br>chlorure mercurique<br>(en mg pour 100 ml) | Temps de<br>latence<br>en<br>heures | Mercurc %<br>restant<br>dans le<br>milieu | Mercurc %<br>fixé par<br>les levures | Mercurc %<br>retrouvé<br>au total |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 0,5                                                                        | 15                                  | 28                                        | 48                                   | 76                                |
|                                                                            | 15                                  | 29                                        | 50                                   | 79                                |
|                                                                            | 15                                  | 23                                        | 44                                   | 67                                |
| Moyenne :                                                                  |                                     | 26,6                                      | 47,3                                 | 74                                |
| 1                                                                          | 32                                  | 21                                        | 35                                   | 56                                |
|                                                                            | 32                                  | 19                                        | 38,5                                 | 57,5                              |
|                                                                            | 32                                  | 27                                        | 27                                   | 54                                |
| Moyenne :                                                                  |                                     | 22,3                                      | 33,5                                 | 55,8                              |
| 1,4                                                                        | 42                                  | 26                                        | 23,5                                 | 49,5                              |
|                                                                            | 42                                  | 27                                        | 21,5                                 | 48,5                              |
|                                                                            | 42                                  | 28                                        | 24                                   | 52                                |
| Moyenne :                                                                  |                                     | 27                                        | 23                                   | 50                                |

L'expérience relatée dans le tableau N° 17 est effectuée avec une levure normale, sur milieu additionné de jus de levure. Le jus de levure a été préparé à partir de 35 g de levure de boulangerie pressée. Dans ces conditions, la concentration initiale supportée par la levure résistante est



de 1,4 mg de chlorure mercurique pour 100 ml.

Nous voyons que si le pourcentage de mercure restant dans le milieu demeure sensiblement constant, le pourcentage fixé par la levure décroît assez régulièrement avec l'augmentation de la concentration en ion mercurique et du temps de latence. D'où le pourcentage de mercure retrouvé au total décroît également. Pour prouver la formation de composés mercuriels volatils, il s'agissait alors de les capter et d'y mettre le mercure en évidence.

#### I - Mise en évidence du phénomène.

Dans ce but, nous avons remplacé l'agitation mécanique du milieu (qui était réalisée par le va-et-vient solidaire du bain-marie d'un appareil de Warburg) par le passage d'un lent courant d'air. A la sortie de l'appareil le gaz passait dans un barboteur à eau : il a été impossible de déceler des quantités appréciables de mercure dans cette eau. L'eau a été remplacée par du sulfure de sodium ; celui-ci a retenu un peu de mercure mais bien moins qu'il n'en disparaissait de la fiole à expérience. Nous avons ajouté 290  $\mu$ g de chlorure mercurique à 20 ml de milieu additionné de jus de levure,ensemencé avec la levure normale. Le courant d'air après avoir traversé le milieu de culture barbote dans 25 ml d'une solution de sulfure de sodium à 10 %. Un deuxième barboteur de sulfure de sodium, mis en série après le premier, se charge aussi de mercure, indiquant bien que la fixation du composé volatil n'était pas totale.

En effet lorsque la croissance est terminée, ce qui demande 4 jours 1/2, le mercure a été dosé ; les quantités retrouvées exprimées en  $\mu$ g de chlorure mercurique figurent dans le tableau N° 18.



TABEAU N° 18

Entraînement du mercure par un courant d'air  
dans le milieu de culture.

| Expérience<br>N° | Chlorure<br>mercurique<br>resté dans la<br>fioule de cul-<br>ture en µg. | Chlorure mercurique (µg)<br>entraîné et fixé<br>dans le<br>Premier<br>barboteur | Deuxième<br>barboteur | Chlorure<br>mercurique<br>retrouvé au<br>total sur les<br>290 µg initiaux |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1                | 180                                                                      | 20                                                                              | 30                    | 230                                                                       |
| 2                | 183                                                                      | 25                                                                              | 17                    | 225                                                                       |
| 3                | 207                                                                      | 49                                                                              | 30                    | 286                                                                       |

Enfin nous avons eu l'idée d'utiliser l'hypobromite de sodium que F. KAYSER (41) utilisait déjà pour solubiliser le sulfure de mercure en vue du dosage.

La solution d'hypobromite de sodium est préparée selon FLEURY (voir 41) ; nous l'employons diluée au 1/5ème.

Solution A

|                                    |      |    |
|------------------------------------|------|----|
| - Lessive de soude Codex (D. 1,35) | 55   | ml |
| - Iodure de potassium              | 0,20 | g  |
| - Eau distillée Q.S.p              | 100  | ml |

Solution B

|                        |         |     |
|------------------------|---------|-----|
| - Brome                | 8,5     | ml  |
| - Bromure de potassium | 50      | g   |
| - Eau distillée        | 82 à 85 | ml. |

On mélange au moment de l'emploi, des volumes égaux de solutions A et B et l'on dilue au 1/5 avec de l'eau distillée.



Effectivement, le passage des gaz dans un barboteur contenant une solution fraîche d'hypobromite retient tout le composé mercuriel qu'ils ont entraîné.

Voici quelques uns des résultats que nous avons obtenus :

TABLÉAU N° 19

| Mercure (exprimé en $\mu\text{g}$ de chlorure mercurique) |                                   |                                                        |                                                            |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Expérience:                                               |                                   |                                                        |                                                            |
| N°                                                        | resté dans la fiole<br>de culture | entraîné puis<br>fixé par l'hypo-<br>bromite de sodium | retrouvé au<br>total sur 1.000 $\mu\text{g}$<br>mis en jeu |
| 1                                                         | 520                               | 540                                                    | 1.060                                                      |
| 2                                                         | 541                               | 502                                                    | 1.043                                                      |
| 3                                                         | 262                               | 728                                                    | 1.000                                                      |

La dose de chlorure mercurique employé, 1.000  $\mu\text{g}$  pour 100 ml de milieu était choisie pour que la levure normale se développe après un temps de latence assez long, montrant nettement qu'une quantité importante de produit mercuriel est volatilisé. En effet, dans ce cas, le mercure fixé par la levure est moindre, il en subsiste davantage dans le milieu et une proportion plus importante se volatilise.

Si les valeurs obtenues dans les expériences 1 et 2 sont comparables, celles de l'expérience 3 est nettement différente ; nous croyons devoir l'attribuer aux irrégularités de fonctionnement de la trompe à eau qui assure le passage du lent courant d'air dans la culture.

Avec la levure résistante, dans les mêmes conditions et avec le même milieu de culture, la quantité de mercure volatil est beaucoup



plus faible ; l'expérience n'a pas été faite, mais les pourcentages de mercure retrouvé dans le milieu et les levures (page 42 ), montrent que, en moyenne, seul 10 % du mercure disparaît. Nous attribuons ce fait à ce que la levure résistante fixe le mercure beaucoup plus vite que la levure normale (voir pages 60-64) et que le mercure restant dans le milieu, seul susceptible de donner un composé volatil, est beaucoup moins abondant.

Les résultats précédents concernent le milieu de culture additionné de jus de levure ; avec le milieu synthétique, les résultats sont beaucoup moins nets ; en présence de levure résistante, il ne se forme pas de composé volatil de mercure, tandis qu'il s'en forme un peu en présence de levure normale ; là non plus, l'expérience n'a pas été faite, mais des chiffres qui figurent page 44 , il résulte que 23 % du mercure a quitté le milieu sous forme d'un composé volatil.

## II - Conditions de formation du composé volatil.

Cette formation d'un composé volatil de mercure dans un milieu contenant du chlorure mercurique nous a paru si surprenante que nous avons d'abord cru qu'il s'agissait d'un entraînement du sublimé, soit parce que ce corps aurait pu être légèrement entraînable dans un courant d'air humide, soit parce qu'il se formerait de minuscules gouttelettes de milieu de culture réalisant une sorte d'aérosol sous l'action du lent courant d'air. Ces hypothèses semblent devoir être rejetées puisque le passage des gaz à travers un tampon de coton serré ne modifie pas les résultats, que l'eau n'arrête pas le composé mercuriel entraîné, que le sulfure de sodium l'arrête incomplètement. D'ailleurs une solution de chlorure mercurique traitée dans les mêmes conditions ne perd que très peu de son titre en mercure.

L'addition de composés chimiques très divers semble de nature à exalter quelque peu la volatilité du chlorure mercurique ; l'addition de phosphate monopotassique 11/15, de saccharose à 2 g pour 100, provo-



que un entraînement de faibles quantités de mercure toujours supérieures à celles que donne le chlorure mercurique seul (par exemple : 25  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique contre 3 au témoin), mais très inférieures à celles que forme le milieu de culture additionné de jus de levure. De même le bisulfite de sodium (0,15 ml de la solution commerciale pour 250 ml) augmente le mercure retrouvé dans le barboteur dans de fortes proportions (2.535  $\mu\text{g}$  entraînés en 24 heures contre 1.620  $\mu\text{g}$  au milieu de culture et 25  $\mu\text{g}$  à la solution de chlorure mercurique seul sur 5.000  $\mu\text{g}$  initiaux).

L'examen des courbes telles que celles du graphique N° 6 montre que le mercure total contenu dans le milieu diminue avec la quantité de mercure ionisé ; il est donc logique de penser que c'est le mercure ionisé qui se combine à un composé organique du milieu pour fournir un composé volatil.

Le fait qu'une partie notable du mercure disparaisse du milieu avant la croissance de la levure nous a incité à nous demander si la levure joue toujours un rôle dans la formation du composé mercuriel volatil.

Tel n'est pas le cas puisqu'un milieu de culture contenant du jus de levure et 4.000  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique dans 100 ml perd jusqu'à 24 % de son mercure par barbotage d'un lent courant d'air pendant 48 heures ; à savoir 318  $\mu\text{g}$  dans les 24 premières heures et 651  $\mu\text{g}$  dans les 24 heures suivantes, de même avec 1.000  $\mu\text{g}$  nous avons retrouvé 85  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique dans le barboteur au bout de 4 heures.

En milieu synthétique et en l'absence de levure, la formation de composé mercuriel volatil est très faible, de l'ordre de ce que fournit la solution de chlorure mercurique au même titre dans l'eau pure.

La présence de levure vivante n'est pas indispensable pour qu'il se forme un composé mercuriel volatil à partir du chlorure mercurique, mais il semble que la levure apporte au milieu synthétique ou que le



jus de levure apporte au second milieu les éléments nécessaires pour qu'il se forme un composé mercuriel volatil dans nos conditions expérimentales de culture.

Le jus de levure est susceptible, à lui seul, de donner en présence de chlorure mercurique, le composé mercuriel entraînable mais cette action est potentialisée par la présence des sels minéraux servant à préparer le milieu ainsi qu'en témoigne l'expérience suivante :

20 ml de liquide sont additionnés de 200  $\mu$ g de chlorure mercurique et soumis à un lent barbotage d'air pendant 8 heures ; les quantités de mercure recueilli, dans les différents cas, dans un barboteur contenant de l'hypobromite sont consignées dans le tableau n° 20 (où le mercure entraîné est exprimé en  $\mu$ g de chlorure mercurique).

TABLEAU N° 20

Mercure (en  $\mu$ g) entraîné par un lent courant d'air

| Expérience<br>N° | Jus de<br>levure | Solution des<br>sels minéraux<br>+ saccharose | Milieu<br>complet. |
|------------------|------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| 1                | 14,5             | 2,5                                           | 30                 |
| 2                | 16               | 4                                             | 30                 |

Il faut cependant préciser que ces expériences sont difficilement reproductibles et nous l'attribuons à l'irrégularité du barbotage d'air obtenu grâce à une trompe à vide. Nous avons eu, dans certains cas, formation de 94,5 et 84,5  $\mu$ g de composé volatil (exprimé en chlorure mercurique) et dans d'autres cas, seulement des traces ; deux expériences



faites simultanément avec une seule trompe à vide donnent des chiffres comparables. Toutes les expériences faites en parallèle entre le milieu additionné de jus de levure et le milieu synthétique ont toujours fourni des valeurs beaucoup plus élevées pour le premier milieu. Malgré tout, nous avons voulu éliminer l'influence du courant d'air et réaliser l'expérience suivante : 10 mg de chlorure mercurique dissous dans 250 ml du premier milieu sont placés à l'étuve à 30° pendant 5 jours, la fiole renfermant le mélange étant reliée à un flacon contenant de l'hypobromite. Au bout de 5 jours, nous faisons le vide rapidement, en reliant le tube distal du barboteur à une trompe à vide, puis nous cherchons si l'hypobromite a fixé du mercure. La réponse est positive, 133  $\mu$ g de mercure (exprimé en chlorure mercurique) ont été retenus indiquant bien que 1,3 % du mercure introduit s'est transformé en un produit volatil même sans action d'un lent courant d'air.

### III - Volatilité du mercure à partir de solutions de chlorure mercurique et de cystéine.

Nous nous sommes évidemment demandé qu'elle pouvait être la nature du composé mercuriel entraînable qui se forme surtout en présence de jus de levure. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature mention de composés organiques du mercure volatils et susceptibles de se former dans les milieux biologiques. Il nous a paru logique de penser que le mercure pouvait se transformer en sulfure mais le sulfure de mercure n'est absolument pas volatil à 30°. Connaissant l'affinité de l'ion mercurique pour les groupements -SH nous avons fait des essais d'entraînement du mercure avec des solutions contenant du chlorure mercurique et de la cystéine ou du glutathion.

Avec ce dernier, nos essais ont été négatifs. Avec la cystéine, les essais ont été faiblement positifs mais peu reproductibles et sont fonction des proportions relatives du chlorure mercurique et de la cystéine.







Le départ du mercure est faible. Pour un rapport  $Hg/S$  inférieur ou égal à  $1/2$ , la volatilité du mercure est nulle. Nous avons constaté que la persistance du mercure ionisé est nécessaire pour la formation du composé volatil.

Lorsqu'on remplace le courant d'air par une agitation mécanique il n'y a pas départ appréciable de mercure. On peut en conclure que ce n'est pas la cystéine, mais un de ses composés d'oxydation, formé sous l'influence de l'air qui est susceptible de donner un composé mercuriel volatil. Nous n'avons pas pu nous procurer de dérivés d'oxydation de la cystéine pour les tester.

Le seul dérivé de la cystéine que nous avons pu trouver dans le commerce est la cystamine ; elle ne fournit pas, dans nos conditions expérimentales avec agitation mécanique, de composé mercuriel volatil lorsqu'on la met en solution en présence de chlorure mercurique.

En conclusion, nous voyons que si nous n'avons pu préciser la nature chimique du ou des composés mercuriels volatils, nous avons mis nettement en évidence leur formation en présence du mercure ionisé dans le milieu de culture et expliqué ainsi pourquoi en fin de croissance, on ne retrouve pas tout le mercure initialement mis en jeu. Le pourcentage de mercure retrouvé est d'autant plus faible que le mercure reste plus longtemps à un taux élevé à l'état ionisé dans le milieu de culture ; c'est surtout le cas de la levure normale croissant en présence de chlorure mercurique et présentant un temps de latence élevé.

\*

\*

\*



### - C H A P I T R E    I I I    -

=====

#### LA RESISTANCE AU CHLORURE MERCURIQUE DE LA SOUCHE ISOLEE PARAIT ATTRIBUABLE A SA PLUS FORTE TENUEUR EN GROUPEMENTS - SH

En 1940, FIELDS (28) montre que l'action antibactérienne des sels de mercure peut s'expliquer par le blocage des groupements -SH intracellulaires dont la présence, en partie à l'état libre, est essentielle pour la croissance. En effet, l'action antibactérienne du mercure est spécifiquement neutralisée par les composés à groupements -SH libres tels que la cystéine, le thioacétate et le glutathion ; au contraire, les composés à groupements conjugués de la forme R-S-S-R tels que la cystine ou à fonction thiol substituée de la forme R-S-R' tels que la méthionine, ne présentent aucun pouvoir protecteur vis à vis de l'action bactéricide du mercure. D'après FIELDS, les mercaptans agiraient sur l'ion mercurique pour donner naissance à un composé R-S-Hg-S-R, de sorte qu'il faudrait deux groupements -SH pour détoxiquer un ion mercurique.

Cette théorie est confirmée par des études enzymologiques récentes, qui portent sur des systèmes enzymatiques possédant des groupements SH dans leur molécule ; ces travaux ont mis en évidence le rôle inhibiteur des sels mercuriels, ainsi que le pouvoir protecteur et réactivateur des mercaptans vis à vis de cette inhibition. JUDE et coll. (40), COOK et coll (21) (22) (23) et THOMAS et COOK (56).

Seul ZAMBONELLI (61) explique la résistance de *Saccharomyces cerevisiae* au nitrate de phénylmercure par une augmentation de la production d'hydrogène sulfuré par la levure.

#### A) INHIBITION DE L'ACTION TOXIQUE DE L'ION MERCURIQUE PAR LA CYSTEINE.



Nous avons a nouveau vérifié cette théorie avec Candida utilis croissant sur milieu contenant des ions mercuriques ; si on ajoute de la cystéine au milieu de culture synthétique, la levure devient alors capable de se développer en présence de quantités accrues de chlorure mercurique. Pour le mettre en évidence nous avons employé une concentration fixe de chlorhydrate de L-cystéine, nous l'avons choisie assez forte pour présenter une action nette, tout en restant dans l'ordre de grandeur des concentrations des autres acides aminés du milieu : 3 mg pour 100 ml en remplacement des 2 mg de méthionine. Avec cette concentration nous avons essayé plusieurs doses de chlorure mercurique et recherché celle pour laquelle le temps de latence commence à augmenter, à ce moment, la cystéine du milieu n'est plus capable de détoxiquer tout le mercure introduit.

Voici comment nous avons opéré : à 100 ml de milieu synthétique, nous ajoutons 3 mg de chlorhydrate de L cystéine et 3 mg de chlorure mercurique. Nous ensemençons avec la souche résistante et constatons que le développement de la levure est normal. Effectivement d'après la conception de FILDES, une molécule de chlorure mercurique ( PM 271,5 ) est neutralisée par 2 molécules de cystéine ( PM 157,62 ), c'est à dire que les 3 mg de cystéine employée devraient neutraliser  $3 \times \frac{271,5}{2 \times 157,6} = 2,6$  mg de chlorure mercurique et laisser subsister dans le milieu  $0,4$  mg de ce sel, dose qui est à peu près celle que la levure résistante peut supporter (350  $\mu$ g pour 100 ml de milieu en moyenne). Donc FILDES avait raison.

Nous nous étions demandé si la cystéine serait susceptible d'augmenter la résistance que notre souche possède vis à vis du mercure et nous avons obtenu une réponse négative (Voir page 24 ) ; nous avons voulu voir si le fait de cultiver la levure en présence de fortes quantités de chlorure mercurique et de cystéine à poids égal, serait capable d'augmenter la résistance de la levure vis à vis du mercure. Nous avons effectué 15 passages successifs de la levure sur milieu synthétique, contenant des concentrations de chlorhydrate de L-cystéine et de chlorure mercurique de 3 mg pour 100 ml, ensuite nous avons testé la résistance de la levure vis à vis du chlorure mercurique



seul, elle n'a pas été modifiée. De même au cours de ces cultures, la résistance de la levure au chlorure mercurique ne varie pas. En présence d'une dose suffisante de cystéine, tout se passe comme si le mercure surajouté était sans action.

D'ailleurs en augmentant la concentration du milieu en cystéine, nous avons pu parallèlement augmenter la dose de chlorure mercurique dans un même rapport. *Candida utilis* a ainsi pu croître sur 12.500 µg de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu, au lieu de 350 µg, lorsque nous ajoutons 15.000 µg de chlorhydrate de L-cystéine. Avec ces concentrations, les cultures acquièrent une coloration noirâtre due vraisemblablement à la formation de mercure réduit ou de SHg, les levures présentent de petits points noirs paraissant situés sur la face externe de leur membrane. Des concentrations plus fortes des deux corps, chlorure mercurique et cystéine, inhibent la croissance.

Ainsi nous avons mis nettement en évidence le pouvoir détoxiquant de la cystéine vis à vis de l'action bactéricide du chlorure mercurique, c'est à dire la grande affinité de l'ion mercurique pour les groupements -SH. Avec des quantités déterminées de cystéine, la levure a pu croître en présence de 12.500 µg de chlorure mercurique pour 100 ml, au lieu de 350 µg, c'est à dire près de 36 fois plus. CAVALLITO et coll (15) ont obtenu des résultats semblables avec *Staphylococcus aureus* ; en milieu de culture liquide, ce germe est inhibé pendant 18 heures par 100 µg de chlorure mercurique pour 100 ml . alors que par addition de quantités suffisantes de cystéine, il supporte des concentrations 200 à 700 fois plus élevées.

#### B) DOSAGE DES GROUPEMENTS -SH CHEZ CANDIDA UTILIS, SOUCHE NORMALE ET SOUCHE RESISTANTE AU CHLORURE MERCURIQUE.

Vu la grande affinité de l'ion mercurique pour les mercaptans, dont le pouvoir détoxiquant est bien connu (50) (78), nous avons pensé qu'un mécanisme explicatif possible de la résistance au chlorure mercurique pourrait être une plus forte teneur de la levure en groupements -SH. C'est pourquoi nous les avons dosés comparativement chez *Candida utilis*, souche normale et souche résistante au chlorure mercurique.



### 1) Méthode utilisée

Comme la plupart des auteurs, nous nous sommes borné à doser -SH contenu dans l'acido-soluble des levures. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de FUJITA-NUMATA (30) modifiée par BRUCKMANN et WERTHEIMER (13) mais en adoptant les proportions des réactifs données par CHINARD et HELLER-MANN (17).

### Réactifs

- 1) Solution saturée de chlorure de sodium
- 2) Acide trichloracétique à 20 %
- 3) Nitroprussiate de sodium 0,1 g  
Sulfate d'ammonium à 4 %, 10 ml.

Dissoudre le nitroprussiate de sodium dans la solution de sulfate d'ammonium immédiatement avant l'emploi.

4) Carbonate de sodium 1,5 M, soit 159 g de sel anhydre par litre d'eau distillée.

### Mode opératoire

Nous ajoutons successivement dans un tube à essai :

- 6 ml du réactif n° 1
- 2 ml d'un mélange, contenant la prise d'essai et 0,8 ml du réactif n°2
- 1 ml du réactif n°3
- 1,5 ml du réactif n°4

Nous agitons après chaque addition de réactif, la lecture colorimétrique est faite immédiatement après addition du carbonate de sodium parce que la coloration violette qui se développe est fugace et regresse déjà après 30 secondes (32). Cette lecture est effectuée au photocolorimètre " Coleman junior " avec une lumière incidente de longueur d'onde 520 mμ. Le résultat est lu en se reportant à une courbe de référence obtenue avec une solution titrée de chlorhydrate de L-cystéine.



Classiquement, la prise d'essai se trouve en solution dans l'acide métaphosphorique à 2%, mais comme nous effectuons nos dosages sur un extrait trichloracétique, nous nous sommes assuré que l'addition d'acide métaphosphorique était inutile et que dans ces conditions opératoires nouvelles, la méthode de dosage demeure valable. Vu la plus forte acidité apportée par la prise d'essai ( 2 ml d'acide trichloracétique à 8% ), nous ajoutons en fin de dosage, 1,5 ml de solution de carbonate de sodium 1,5 M au lieu de 1 ml préconisé par CHINARD et HELLEPMANN. Nous obtenons ainsi un développement correct et immédiat de la coloration violette.

Les droites obtenues sur le graphique n° 9 montrent que dans nos conditions opératoires, la loi de Beer-Lambert est vérifiée jusqu'à 250 µg de chlorhydrate de L-cystéine contenu dans les 2 ml de prise d'essai ; mais la pente de la droite n'est pas rigoureusement constante d'une série d'essais à une autre, aussi avant chaque série de dosages, construisons-nous une courbe de référence.

Nous avons vérifié que la coloration qui se développe est bien due aux groupements -SH libres, le glutathion à concentration moléculaire égale donne la même intensité de coloration que la cystéine.

Enfin le chlorure mercurique empêche la réaction colorée car il masque les groupements -SH. Si, avec FILDES, on pense qu'il se forme le composé  $R-S-Hg-S-R$  donc que 2 molécules de cystéine sont nécessaires pour masquer 1 Hg, lorsque le rapport  $Hg/S$  du mélange est inférieur à  $1/2$ , la réaction doit être négative, ce qui se produit effectivement, lorsque ce rapport est supérieur à  $1/2$ , une partie des groupements -SH devient titrable par le nitroprussiate, mais nous n'avons pu obtenir de résultats quantitatifs en accord avec cette théorie. Il se forme sans doute un équilibre facilement modifiable entre les composés  $R-S-Hg-S-R$ ,  $R-S-Hg-Cl$  et  $R-SH$ .



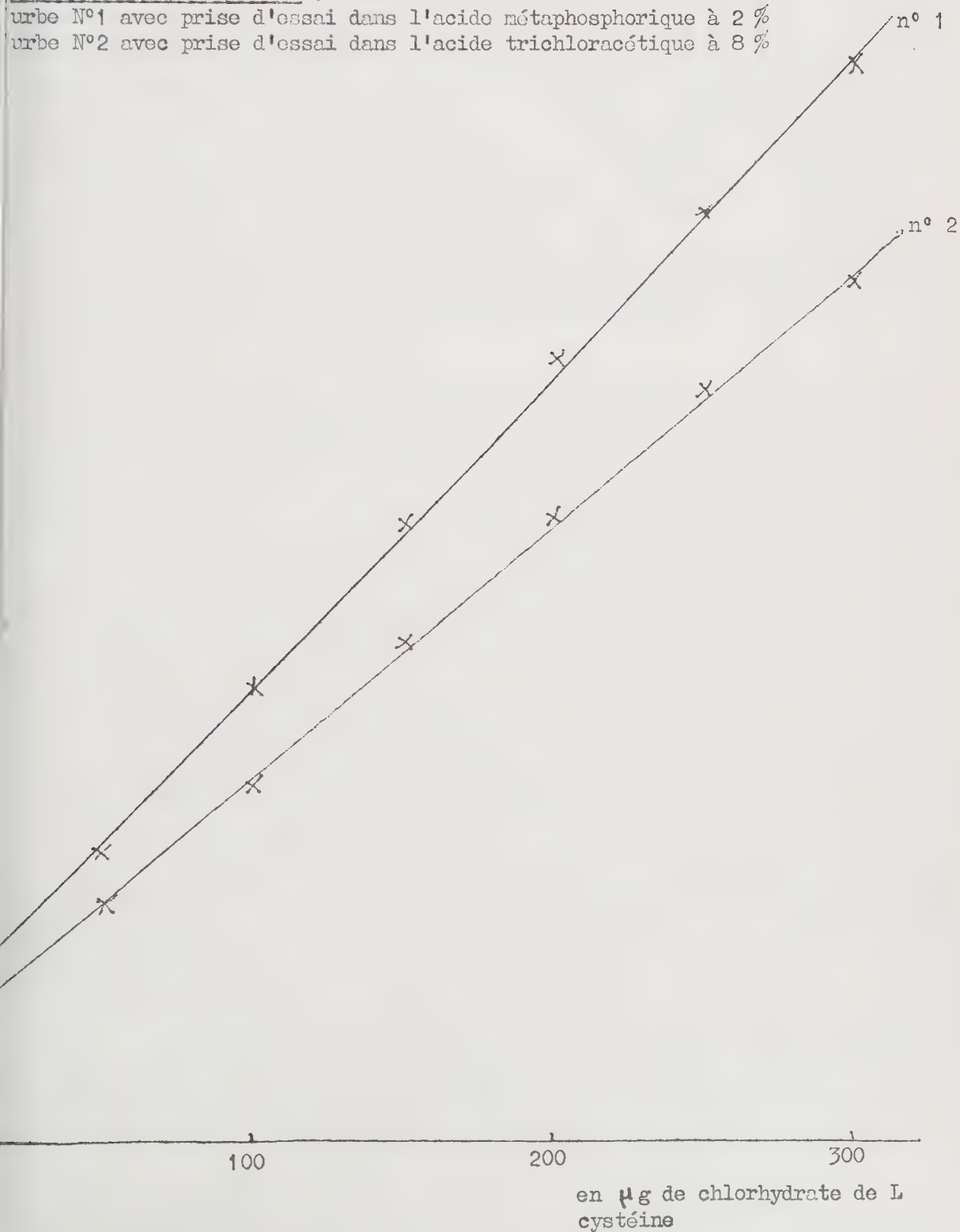
(x 100)

GRAPHIQUE N° 9

dosage des groupements -SH : courbes de référence

Curve N°1 avec prise d'essai dans l'acide métaphosphorique à 2 %

Curve N°2 avec prise d'essai dans l'acide trichloracétique à 8 %





## II) Extraction des groupements -SH de la levure

Nous avons dosé les groupements -SH dans l'acido-soluble de la levure, cette dénomination " acido-soluble " s'applique à tous les corps organiques ou minéraux qui passent en solution quand on traite les bactéries par l'acide trichloracétique dans le but d'insolubiliser " in situ " les matières protéiques (10). Ces substances acidosolubles comprennent en particulier des acides aminés libres et des polypeptides à courte chaîne parmi lesquels se trouvent des corps possédant un ou plusieurs groupements -SH libres.

Nous avons donc extrait nos levures par l'acide trichloracétique à froid en employant la technique courante déjà utilisée par BOIVIN (10) et DIRHEIMER (26).

Nous partons d'une culture faite sur 20 ml de milieu, en fin de croissance, dont la densité optique est voisine de 120. Les levures sont séparées par centrifugation et lavées 2 fois à l'eau distillée froide. Le culot de levure est alors mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée froide, 2 ml de cette suspension vont nous servir pour déterminer l'extrait sec, aux 8 ml restant nous ajoutons un volume égal d'acide trichloracétique à 20% afin de réaliser une concentration finale de 10% en acide. Nous laissons en contact pendant 24 heures au froid en agitant de temps en temps.

## III) Dosage des groupements -SH

Après centrifugation pour éliminer les cellules de levure, le dosage est effectué directement sur 2 ml de l'extrait trichloracétique, qui a été au préalable amené au volume final de 20 ml avec de l'eau distillée. Chaque prise d'essai contient donc 0,8 ml d'acide trichloracétique à 20% puis-que le dosage est effectué sur 1/10 ème de l'acido-soluble total ; parallèlement nous traçons une courbe de référence en ajoutant la même quantité d'acide trichloracétique à la solution titrée de cystéine.

Nous effectuons simultanément l'extraction sur la souche normale et sur la souche résistante au chlorure mercurique, qui a poussé sur milieu dépourvu de ce sel, pour éviter que l'ion mercurique ne masque les groupements



-SH à la réaction au nitroprussiate. Le reste du dosage est effectué comme il est indiqué.

#### IV) Résultats

Les teneurs en groupements -SH de l'acido-soluble de la levure normale et de la levure résistante sont consignées dans le tableau n° 22.

Nous exprimons les résultats trouvés en mg de chlorhydrate de L-cystéine par gramme de matière sèche.

TABEAU N° 22

Teneur en groupements -SH de l'acido-soluble de Candida utilis

|                                               |                                                                      |         |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------|
| mg de cystéine par gramme<br>de levure sèche. |                                                                      | Moyenne |
| Levure normale                                | 1,8 - 1,9 - 1,9 - 2,0 - 2,2<br>2,2 - 2,3 - 2,4 - 2,4 - 2,7           | 2,2     |
| Levure résistante                             | 10,9 - 11,7 - 12,1 - 12,5 - 12,7<br>12,9 - 12,9 - 13,3 - 13,4 - 15,4 | 12,8    |

Ce tableau montre que la teneur de la levure en groupements -SH est assez constante et que la levure résistante est, en moyenne, 6 fois plus riche que la levure normale.

Or parallèlement la souche résistante au chlorure mercurique supporte une concentration initiale de ce sel 6 à 7 fois plus forte que la souche normale ( 300 à 350 µg de chlorure mercurique contre 50 µg pour 100 ml de milieu synthétique et 750 µg de chlorure mercurique contre 100 µg en milieu additionné de jus de levure).

Vu la grande affinité du mercure pour les mercaptans, il est lo-



gique de penser, que cette augmentation des groupements -SH chez la levure résistante, lui permet de fixer une plus grande quantité de mercure que ne peut le faire la levure normale, comme nous l'avons montré dans le chapitre II, page 48, tout en conservant assez de groupements -SH pour assumer son métabolisme vital. Ce mécanisme rendrait compte de la résistance d'une de nos souches de *Candida utilis* au chlorure mercurique.

Enfin nous avons calculé approximativement, pour la levure résistante au chlorure mercurique, le rapport Hg/S du mercure fixé par la levure au moment où la croissance n'est pas encore visible à la teneur en groupements -SH de l'acido-soluble ; la levure est cultivée sur milieu additionné de jus de levure. Ce rapport reste valable pour la souche normale puisque l'augmentation de la résistance au chlorure mercurique et l'augmentation de la teneur en groupement -SH sont de même ordre.

D'après les résultats du graphique n° 7, nous voyons que la levure résistante peut fixer environ 4,5 µg de mercure par ml de milieu, sous forme de chlorure mercurique, avant de commencer à se développer, soit 90 µg pour une fiole contenant 20 ml de milieu ; les 90 µg sont donc fixés par des levures contenues dans l'inoculum, soit 0,5 ml d'une suspension dont l'extrait sec est approximativement de 2,5 mg, de sorte que 1 g de levure sèche a fixé 36 mg de mercure ( exprimé en chlorure mercurique ). La teneur de 1 g de levure sèche en groupements -SH ( exprimé en cystéine ) est de 12,8 mg. Le rapport du mercure fixé par la levure ( exprimé en mg de chlorure mercurique, PM = 271,5 ) aux groupements -SH de la levure ( exprimés en mg de cystéine de PM = 157,6 ) est  $\frac{\text{Hg}}{\text{S}} = \frac{36 : 271,5}{12,8 : 157,6} = 1,64$

Si tout le mercure était fixé sur les groupements -SH à raison de 2 -SH pour 1 Hg comme le proposait FILDES, on devrait trouver  $\text{Hg} / \text{S} = 1/2$ . La quantité de mercure fixé est donc environ trois fois plus forte que ne le voudrait la théorie. Mais, il peut aussi se former des composés de type R-S-Hg-Cl avec un rapport  $\frac{\text{Hg}}{\text{S}} = 1$ , d'autre part, la levure au cours de son métabo-



lisme peut vraisemblablement synthétiser, dans une certaine mesure, de nouveaux groupements -SH au fur et à mesure que le mercure se combine avec ceux qui existent. De plus, il peut y avoir dans la levure des groupements -SH ailleurs que dans l'acido-soluble, enfin des groupements -SH libres dans le microorganisme vivant ont pu s'oxyder ou se substituer au cours des manipulations; toutes ces considérations nous font penser qu'il n'est pas étonnant que le rapport  $\frac{Hg}{S}$  qui devrait être compris entre 0,5 et 1 puisse avoir été trouvé égal 1,64.

Afin de montrer que la plus forte teneur en groupements -SH de l'acido-soluble de la levure résistante est spécifique de cette souche, et n'est pas due à la croissance de la levure en présence de chlorure mercurique, nous avons cultivé une levure normale sur milieu additionné de jus de levure contenant 1000  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 100 ml, la pousse a eu lieu en 3 jours, puis après avoir cultivé à nouveau cette levure sur le même milieu exempt de chlorure mercurique nous avons dosé sa teneur en groupements -SH. D'après les résultats consignés dans le tableau n°23, nous voyons que le contact avec le chlorure mercurique n'a pas modifié sa teneur en groupements -SH.

TABLEAU N° 23

Teneur en groupements -SH de différentes souches de Candida utilis

|                                               | Cystéine en mg par gramme<br>de matière sèche. |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Levure normale                                | 1,9                                            |
| Levure après passage sur milieu<br>mercurique | 1,4<br>1,6                                     |
| Levure résistante                             | 11,6                                           |



Nous ne sommes pas parvenus à augmenter la teneur de la levure en groupements -SH (voir page 24); mais nous avons pensé que lorsque la levure se développe, elle synthétise de nouveaux mercaptans, chaque cellule nouvelle devant être aussi riche en groupements -SH que la cellule mère. Ainsi une culture en développement doit pouvoir tolérer des quantités de chlorure mercurique, qui augmentent proportionnellement au nombre de cellules existant dans le milieu au moment de l'addition du toxique.

Pour le vérifier nous avons réalisé l'expérience suivante : nous avons ensemencé 5 fioles, contenant 20 ml de milieu synthétique, avec la levure résistante sur 300 µg de chlorure mercurique pour 100 ml, au bout de 5 heures 1/2, la densité optique est double de sa valeur initiale ; nous avons alors ajouté des quantités variables de chlorure mercurique ; la densité optique a été mesurée à nouveau au bout de 7 heures 1/2 et de 24 heures, les résultats obtenus sont les suivants ( voir tableau n° 24 ).

TABIEAU N° 24

| Culture | Addition de chlorure mercurique en µg pour 100 ml, après 5 h 30. | Densité optique ( x 100 ) |                                                                        |                 |               |
|---------|------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|
|         |                                                                  | ini-<br>tiale             | Lors de<br>l'addi-<br>tion de<br>Cl <sub>2</sub> Hg<br>après<br>5 h 30 | après<br>7 h 30 | après<br>24 h |
|         |                                                                  |                           |                                                                        |                 |               |
| Témoin  | 0                                                                | 11                        | 24                                                                     | 40              | 120           |
| N° 1    | 300                                                              | 10                        | 21                                                                     | 34              | 118           |
| N° 2    | 600                                                              | 10,5                      | 20                                                                     | 28              | 115           |
| N° 3    | 900                                                              | 10                        | 21,5                                                                   | 31              | 85            |
| N° 4    | 1.200                                                            | 10,5                      | 24                                                                     | 33              | 42            |



La croissance des cultures N° 1 et 2 a été à peine ralentie dans les heures qui ont suivi l'addition du chlorure mercurique et a atteint, en 24 heures, la même densité optique que le témoin ; cela était prévisible l'essai N° 2, contenant 2 fois plus de cellules que l'inoculum devait pouvoir résister à une dose de mercure double ( 600  $\mu$ g au lieu de 300  $\mu$ g ) ; au contraire les essais n° 3 et 4 qui contenaient des doses plus fortes de mercure n'ont atteint qu'un développement incomplet.

Nous voyons donc que de nouveaux groupements -SH ont été synthétisés par les cellules nées dans le milieu de culture ; elles permettent à la levure de résister à de nouvelles quantités de chlorure mercurique.

C) - LA TENEUR PLUS ELEVEE EN GROUPEMENTS -SH DE LA LEVURE RESISTANTE LUI COMMUNIQUE-T-ELLE D'AUTRES PROPRIETES ?

1) Résistance vis à vis d'autres métaux.

L'étude de la résistance des microorganismes vis à vis des antiseptiques et des antibiotiques avait permis de mettre en évidence le phénomène de résistance croisée, lorsqu'un microorganisme rendu résistant à un antibiotique l'est devenu également envers un autre. Des indications intéressantes sur le mode d'action des antibiotiques ont pu être tirées de telles études deux antibiotiques vis à vis desquels la résistance s'acquiert simultanément agissent probablement par un même mécanisme.

Nous nous sommes demandé si notre levure résistante au chlorure mercurique serait susceptible de résister à d'autres métaux toxiques, dont on aurait pu penser à priori, que le mode d'action antiseptique était de même nature. Nous avons étudié comparativement la toxicité des ions cuivrique

cadmique et aurique et aussi de l'arséniate vis à vis de la levure normale et de notre souche de levure résistante au mercure. Nous avons choisi des ions qui donnent des sulfures insolubles, pensant que leur mécanisme d'action serait identique à celui du mercure.

Nous ne nous sommes pas adressé à l'ion argentique à cause de la gêne que la formation de chlorure d'argent insoluble apporte à nos déterminations.



a) Techniques utilisées

Nos essais ont été effectués en milieu synthétique parallèlement entre la levure normale et la levure résistante qui vient de croître sur milieu dépourvu de chlorure mercurique, pour éliminer la presque totalité du mercure fixé par la levure.

Chaque souche est alorsensemencée sur des concentrations régulièrement croissantes du cation étudié et le développement est suivi par rapport au témoin ensemencé sur milieu normal.

b) Résultats

1) Résistance à l'ion cuivrique ( étudiée avec un solution de sulfate de cuivre cristallisé ).

Le tableau n° 25 donne un exemple des résultats obtenus, les différents essais que nous avons réalisés nous ont fourni des résultats concordants.

TABLEAU N° 25

Croissance de Candida utilis sur milieu additionné d'ion cuivrique

| Levure normale |                                              |                                               |     | Levure résistante au mercure |                                              |                                               |     |
|----------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----|------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----|
| Essais<br>N°   | Concentration en Cu<br>++ mg pour<br>100 ml. | Densité optique<br>(x 100)<br>Temps en heures |     | Essai<br>N°                  | Concentration en Cu<br>++ mg pour<br>100 ml. | Densité optique<br>(x 100)<br>Temps en heures |     |
|                |                                              | 0 : 8h 30 : 24                                |     |                              |                                              | 0 : 8h 30 : 24                                |     |
| Témoin         | 0                                            | 10,5 : 80                                     | 128 | Témoin                       | 0                                            | 10 : 57                                       | 120 |
| 1              | 3,75                                         | 11,5 : 52                                     | 130 | 1                            | 12,5                                         | 11,5 : 23                                     | 120 |
| 2              | 7,50                                         | 11,5 : 19                                     | 128 | 2                            | 17,5                                         | 11,5 : 16                                     | 115 |
| 3              | 11,25                                        | 11,5 : 14,5                                   | 40  | 3                            | 37,5                                         | 12,5 : 13                                     | 20  |
| 4              | 15                                           | 11,5 : 12,5                                   | 13  | 4                            | 50                                           | 12 : 15                                       | 15  |



Les résultats obtenus peuvent se résumer ainsi : la levure normale présente une croissance analogue à celle du témoin jusqu'à une concentration de 7,5 mg de cuivre pour 100 ml tandis que la levure résistante au mercure ne voit sa croissance retardée que pour des concentrations en ion cuivrique supérieures à 15 mg de cuivre pour 100 ml.

L'inhibition totale de la croissance pendant 24 heures au moins est obtenue pour une concentration de 15 mg de cuivre pour 100 ml avec la levure normale contre 50 mg avec la levure résistante au mercure.

La résistance au chlorure mercurique s'étend donc partiellement à l'ion cuivrique, la levure résistante supporte deux fois plus de cuivre que la levure normale et l'inhibition de sa croissance en 24 heures n'est obtenue que par une concentration trois fois supérieure.

Il faut remarquer que les doses de cuivre supportées par la levure sont beaucoup plus fortes que celles de mercure : 17,5 mg de cuivre pour 100 ml de milieu pour la levure résistante contre 0,29 mg de mercure, ce qui donne un rapport moléculaire  $\frac{\text{Cu}}{\text{Hg}} = 190$

## 2) Résistance à l'ion aurique

PORTER (50) rapporte la toxicité importante des sels d'or vis à vis des bactéries et écrit que ces sels pourraient agir de la même manière que les sels de mercure. Aussi pouvions nous penser que la résistance au mercure s'étendrait aux sels d'or, mais les résultats obtenus ne nous ont pas permis de corroborer une telle hypothèse, peut-être est-ce dû à la réduction rapide de la solution de chlorure aurique au contact du milieu de culture, celle-ci donne rapidement une coloration rose.

Un exemple des résultats obtenus est consigné dans le tableau N° 26.



TABLEAU N° 26

Croissance de Candida utilis sur milieu additionné d'ion aurique.

| Levure normale |                                             |                            |                 |     | Levure résistante |                                             |                            |                 |      |
|----------------|---------------------------------------------|----------------------------|-----------------|-----|-------------------|---------------------------------------------|----------------------------|-----------------|------|
| Expérience     | Concentration en Au<br>+++ mg<br>pour 100ml | Densité optique<br>(x 100) | Temps en heures |     | Expérience        | Concentration en Au<br>+++ mg<br>pour 100ml | Densité optique<br>(x 100) | Temps en heures |      |
| ce N°          |                                             |                            | 0 : 7,30 : 24 : |     | N°                |                                             |                            | 0 : 7,30 : 24 : |      |
| Témoin         | 0                                           | 11                         | 65              | 120 | Témoin            | 0                                           | 12                         | 45              | 120  |
| 1              | 1,30                                        | 11,5                       | 16,5            | 118 | 1                 | 2,60                                        | 15                         | 28              | 130  |
| 2              | 1,95                                        | 13,5                       | 21              | 122 | 2                 | 3,25                                        | 15,5                       | 29              | 60   |
| 3              | 2,60                                        | 14                         | 22              | 49? | 3                 | 3,90                                        | 17,5                       | 25              | 33 ? |
| 4              | 3,25                                        | 16                         | 25              | 36? | 4                 | 4,55                                        | 19,5                       | 27,5            | 41 ? |
| 5              | 3,90                                        | 18                         | 23              | 48? | 5                 | 5,20                                        | 20                         | 29              | 36 ? |

Remarque : Seules les fioles n° 1, 2 et 3 (levure normale) et 1 et 2 (levure résistante) ont une croissance normale, les fioles 3 (levure normale) et 2 (levure résistante) ont légèrement poussé ; les autres pas du tout, leurs densités optiques élevées sont dues à la coloration rose de l'or réduit.

La levure résistante a une croissance normale en présence de 2,60 mg d'or pour 100 ml du milieu contre 1,95 mg à la levure normale ; son inhibition est totale en 24 heures avec 3,90 mg d'or pour 100 ml contre 3,25 mg à la levure normale. La répercussion de la résistance au mercure vis à vis de l'or est donc très faible.

### 3) Résistance à l'ion cadmique (avec une solution de sulfate de cadmium).

La levure résistante au mercure ne présente aucune augmentation de sa résistance au sulfate de cadmium par rapport à la levure normale. Celle-ci est environ de 18 mg de cadmium pour 100 ml, l'inhibition totale de la croissance en 24 heures est obtenue par une concentration de 88 mg de cadmium pour 100 ml.



4) Résistance à l'arséniate (avec une solution d'arséniate de sodium).

La toxicité de l'arséniate est la même pour les deux souches de levure. Celles-ci résistent à 12,5 mg exprimé en arsenic pour 100 ml, l'inhibition n'est pas totale en 24 heures avec une concentration de 60 mg pour 100 ml.

c) Conclusion. Nous voyons que la souche de *Candida utilis* résistante au mercure est légèrement résistante au cuivre, très faiblement à l'or et se comporte comme la levure normale vis à vis du cadmium et de l'arséniate. Ce qui semble indiquer que le mécanisme de résistance des germes vis à vis de ces métaux est nettement différent de celui du mercure, puisque même dans le cas du cuivre où la résistance est nettement augmentée, il y a une telle disproportion entre les quantités de cuivre et de mercure tolérés, qu'il est impensable que les mêmes mécanismes soient mis en cause.

## II) Fixation du chlorure mercurique par *Candida utilis* en "resting cells".

Nous avons vu que la levure résistante, croissant en milieu de culture synthétique ou additionné de jus de levure, ne produit pas ou peu de composé mercuriel volatil et fixe beaucoup plus de mercure que la levure normale. Nous avons voulu voir si cette différence persiste en milieu non proliférant.

### a) Etude quantitative du mercure fixé

La fixation de chlorure mercurique et de divers sels de mercure a déjà été étudiée par BENIGNO et SANTI (3),(4),(5),(6),(8). et BENIGNO (2). dans le cas de *Staphylococcus aureus*. Ces auteurs mettent un nombre déterminé de germes, filtrés et lavés, en suspension dans une solution du sel de mercure étudié dans l'eau distillée ; après un temps de contact variable, ils dosent le mercure fixé par les germes et déterminent la dose mortelle du produit fixé en tentant le développement ultérieur des cultures. BENIGNO et SANTI montrent que la quantité de chlorure mercurique fixé est importante et que si on maintient constant le rapport : nombre de germes / quantité de chlo-



chlorure mercurique offert, la quantité de chlorure mercurique fixé est sensiblement constante par milliard de germes. Ils étudient aussi la fixation quantitative du chlorure mercurique sur les germes devenus résistants par passages successifs sur des doses régulièrement croissantes de ce sel, dans le but d'établir que la variation de résistance à un composé mercuriel, chez un même germe, s'accompagne d'une variation de la fixation du toxique.

Après 24 heures de contact entre la suspension de germes et le toxique, le mercure est dosé. Les auteurs italiens montrent que la quantité de mercure qui se fixe est du même ordre de grandeur pour la souche normale et la souche résistance, mais que cette dernière n'est tuée qu'après fixation d'une dose de métal 100 fois supérieure à celle qui est mortelle pour la souche normale. Ce qui conduit BENIGNO et SANTI à l'hypothèse suivante "la souche résistante est capable de transformer la drogue en un produit inerte, ne faisant plus partie d'un métabolite essentiel".

#### 1) Techniques utilisées

Tous nos essais se sont déroulés suivant les mêmes conditions expérimentales ; nous avons fait varier deux facteurs : le temps de contact de la suspension bactérienne avec le chlorure mercurique et la concentration de ce dernier. Nous cultivons les levures sur 20 ml de milieu additionné de jus de levure, chaque expérience est effectuée en double pour la souche normale et pour la souche résistante, qui a étéensemencée sur milieu dépourvu de chlorure mercurique, ainsi l'inoculum de la levure résistante apporte au maximum 5  $\mu$ g de chlorure mercurique, cette quantité est négligeable par rapport au chlorure mercurique fixé ultérieurement. Nous travaillons sur des cultures en fin de croissance qui atteignent des opacités identiques : densité optique ( $\times 100$ ) voisine de 120, afin d'avoir une même quantité de levure dans chaque expérience.

La levure séparée du milieu de culture par centrifugation, est lavée à deux reprises avec une solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1.000,



puis remise en suspension dans 20 ml de cette solution contenant une quantité fixe de chlorure mercurique. Ce mélange est agité continuellement à 30° pendant un temps déterminé. Puis la levure est centrifugée et lavée deux fois avec la solution de chlorure de sodium pour éliminer l'excès de chlorure mercurique.

Une partie de la levure est ensuite minéralisée et le mercure fixé est dosé, une autre partie est ensemencée sur milieu synthétique pour étudier la survie de la levure.

## 2) Résultats

Dans une première série d'expériences (résumée dans le tableau n° 27), nous avons mis en contact pendant 15 minutes nos deux souches de *Candida utilis*, normale et résistante, avec des doses de chlorure mercurique comprises entre 0,4 et 50 mg et nous avons déterminé la quantité de mercure (exprimé en chlorure mercurique) fixé par la levure ; ensuite cette levure qui a fixé du mercure en resting-cells est réensemencée sur milieu synthétique et conservée pendant 48 heures, si aucun développement ne se produit, la levure est considérée comme étant tuée par le sel mercuriel.

.../...



TABEAU N° 27

Mercure fixé par Candida utilis en resting cells et survie des germes.

| Souche normale        |               |             | Souche résistante     |               |         |
|-----------------------|---------------|-------------|-----------------------|---------------|---------|
| Chlorure mercurique : |               |             | Chlorure mercurique : |               |         |
| en mg                 | Développement |             | en mg                 | Développement |         |
|                       | ultérieur     |             |                       | ultérieur des |         |
| Quantité :            | Quantité :    | des levures | Quantité :            | Quantité :    | levures |
| ajoutée :             | fixée :       |             | ajoutée :             | fixée :       |         |
| 0,40                  | 0,37          | ++          | 0,75                  | 0,67          | ++      |
| 0,60                  | 0,54          | +           | 1,00                  | 0,93          | ++      |
| 0,80                  | 0,71          | +           | 1,25                  | 1,13          | ++      |
| 1,00                  | 0,97          | -           | 1,50                  | 1,26          | +       |
| 2,00                  | 1,25          | -           | 2,00                  | 1,62          | -       |
| 3,00                  | 1,41          | -           | 3,00                  | 2,15          | -       |
| 5,00                  | 1,47          | -           | 5,00                  | 2,88          | -       |
| 10,00                 | 1,46          | -           | 10,00                 | 2,99          | -       |
| 50,00                 | 2,13          | -           | 50,00                 | 4,23          | -       |
| 50,00                 | 2,13          | -           | 50,00                 | 4,33          | -       |

Nous avons vérifié qu'un temps de contact de 3 minutes suffit pour que la fixation du mercure soit maximum ; si le temps de contact augmente, sa durée n'intervient plus. Cette rapidité de fixation de certains cations a été notée par ROTHSTEIN (52) qui opère avec le cation uranyle  $UO_2^{++}$  divalent comme le cation mercurique.

D'après les quantités de mercure fixé par la levure normale et résistante consignées dans le tableau N° 27, nous voyons que la capacité de fixation du mercure est de même ordre si la quantité ajoutée est inférieure ou égale à 1 mg de chlorure mercurique ; la fixation du mercure est alors de l'ordre de 90%. En augmentant les quantités initiales du toxique, le pour-



centage de mercure fixé diminue rapidement ; la levure résistante fixe approximativement deux fois plus de mercure que la levure normale pour une quantité de chlorure mercurique égale ou supérieur à 3 mg.

Pour confirmer ces résultats, nous avons fait quelques déterminations en opérant dans des conditions invariables : 10 mg de chlorure mercurique dans 20 ml d'une suspension contenant les levures de 20 ml de culture, le temps de contact est de 15 minutes.

Les résultats de 3 expériences faites chacune en double sont consignés dans le tableau N° 28.

TABLEAU N° 28

Mercure fixé par Candida utilis en resting-cells  
(exprimé en mg de chlorure mercurique)

| Expérience N° | Levure normale | Levure résistante |
|---------------|----------------|-------------------|
| 1             | 1,05 - 1,22    | 2,67 - 3,38       |
| 2             | 1,38 - 1,40    | 3,29 - 3,50       |
| 3             | 1,74 - 1,78    | 3,19 - 3,28       |
| Moyenne       | 1,44           | 3,22              |

Les résultats sont assez concordants et la valeur moyenne trouvée est voisine de celle indiquée dans le tableau N° 27, à savoir 1,46 mg et 2,99 mg respectivement. La levure résistante a fixé deux fois plus de mercure que la levure normale.

b) Fixation du mercure en resting-cells et temps de contact

Nous avons vu que si le temps de contact entre la suspension de germes et le chlorure mercurique est supérieur à 3 minutes, la fixa-



tion du mercure par les cellules n'augmente plus. Il en est tout autrement si la durée du contact est brève, mais dans ce cas, elle est malaisée à apprécier, à cause de la centrifugation qui suit et dont il est difficile de dire dans quelle mesure elle doit compter dans le temps de contact.

La levure est agitée pendant 15 à 30 secondes avec la même quantité de chlorure mercurique : 10 mg, puis centrifugée aussitôt pendant 1 minute, enfin le culot est lavé avec la solution de chlorure de sodium à 9 g pour 1.000. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau N° 29.

TABLEAU N° 29

Mercure fixé par Candida utilis en resting-cells avec un temps de contact très bref (15 à 30 secondes).

(exprimé en mg de chlorure mercurique)

| Expérience N° | Levure normale | Levure résistante |
|---------------|----------------|-------------------|
| 1             | 0,99 - 1,12    | 0,49 - 0,58       |
| 2             | 1,06 - 1,07    | 0,58 - 0,59       |
| 3             | 0,91 - 0,97    | 0,49 - 0,52       |
| Moyenne       | 1,02           | 0,54              |

Remarque : Comme précédemment, les levures sont tuées par la concentration de mercure mise en oeuvre.

Les quantités de mercure fixé sont moindres que lorsque le temps de contact est plus long. Mais alors que pour la levure normale, la quantité de mercure fixé ne diminue que de  $\frac{1}{3}$ , pour la levure résistante, elle n'atteint pas le  $\frac{1}{6}$  ème. Ce résultat nous a semblé paradoxal, placées dans une solution contenant une grande quantité de chlorure mercurique, la levure nor-



male et résistante se comportent différemment en fonction du temps de contact, s'il est de plusieurs minutes, la souche résistante fixe 2 fois plus de mercure que la souche normale, s'il est d'une fraction de minute, la souche résistante fixe deux fois moins de mercure que la souche normale. Lorsque le contact avec le mercure est bref, la souche résistante se sature proportionnellement beaucoup moins que la souche normale, ce qui fait penser que chez la levure résistante, les groupements -SH quoique plus nombreux, seraient plus difficiles à atteindre par le mercure.

c) Survie des levures après fixation de mercure en resting-cells.

D'après les résultats du tableau N° 27, nous voyons que la levure normale est tuée, dans nos conditions expérimentales en resting-cells, par une concentration initiale de 1 mg de chlorure mercurique dans 20 ml de suspension, alors que pour la levure résistante 2 mg sont nécessaires. Les quantités de mercure fixé par les levures sont respectivement de 0,97 mg pour la souche normale et 1,62 mg pour la souche résistante, c'est à dire 1,7 fois plus. De sorte que nos résultats ne sont pas superposables à ceux de BENIGNO et SANTI (7) effectués, il est vrai, sur un autre microorganisme : *Staphylococcus aureus*, pour lequel la souche résistante n'est tuée que par une fixation 100 fois plus forte de mercure que la souche normale.

D'autre part sur milieu de culture additionné de jus de levure, l'inoculum (0,5 ml d'une culture de levure résistante) se développe normalement en présence d'une concentration de 150  $\mu$ g de chlorure mercurique pour 20 ml de milieu, or en resting-cells, nous opérons sur un nombre de cellules 40 fois supérieur à celui utilisé dans les cultures actives ; 40 fois 150  $\mu$ g font 6.000  $\mu$ g = 6 mg. Ainsi en culture active, 6 mg sont tolérés alors qu'en resting-cells, 2 mg tuent les cellules. Cette différence de comportement de la levure est-elle due à la concentration plus élevée du toxique ou à une fixation diminuée du mercure en resting-cells ? ou encore, les cellules dont le métabolisme est ralenti (resting-cells) sont-elles de ce fait plus sensibles à l'action du mercure ? pour étudier ces hypothèses nous avons institué l'expérience suivante.



Nous avons effectué les mêmes expériences que précédemment mais en diluant la suspension de germes au 1/40 avec de l'eau distillée, pour nous trouver dans les mêmes conditions de concentration en chlorure mercurique que dans le milieu de culture additionné de jus de levure. Nous avons ajouté à des levures résistantes des quantités de chlorure mercurique dissous dans l'eau distillée correspondant à la concentration obtenue dans nos milieux de culture et nous avons opéré en présence de quantités croissantes de mercure. Les résultats sont consignés dans le tableau N° 30.

TABIEAU N° 30

mercure fixé par Candida utilis souche résistante en resting-cells et survie des germes en fonction de la concentration initiale de chlorure mercurique.

| Essais<br>N° | Levures contenues dans 1 ml<br>de milieu      |                                         | Chlorure mercurique<br>fixé par les levures<br>contenues dans<br>20 ml de milieu<br>(en $\mu$ g) |    | Développement ulté-<br>rieur des cultures |
|--------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------|
|              | Chlorure mercurique<br>ajouté<br>(en $\mu$ g) | fixé par les<br>levures<br>(en $\mu$ g) |                                                                                                  |    |                                           |
| 1            | 140                                           | 56                                      | 1.120                                                                                            | ++ |                                           |
| 2            | 140                                           | 70                                      | 1.390                                                                                            | ++ |                                           |
| 3            | 300                                           | 189                                     | 3.780                                                                                            | ++ |                                           |
| 4            | 500                                           | 213                                     | 4.260                                                                                            | +  |                                           |
| 5            | 1.000                                         | 232                                     | 4.640                                                                                            | -  |                                           |
| 6            | 2.500                                         | 219                                     | 4.380                                                                                            | -  |                                           |

Lorsque la levure résistante est mise en contact, en resting-cells, avec des concentrations de chlorure mercurique identiques à celles du milieu synthétique (essais N° 1 et 2) ou du milieu additionné de jus de levure (essai



n° 3), la levure n'est pas tuée et la proportion de mercure fixé est du même ordre qu'en milieu de culture. En effet, nous avons vu, page 87 que la levure résistante, contenue dans 20 ml de milieu de culture, fixe approximativement 5,6 mg de mercure exprimé en chlorure mercurique, au cours de son développement sur milieu additionné de jus de levure, milieu où la quantité de chlorure mercurique fixé est la plus forte. Dans l'essai N° 3, du tableau N° 30, le chlorure mercurique fixé correspondant aux levures de 20 ml de milieu est de 5,78 mg, c'est à dire approximativement la même quantité qu'en culture active.

De même, le tableau N° 28 montre que les levures résistantes en resting-cells ont fixé en moyenne 3,22 mg de chlorure mercurique.

Nous avons vu (tableau N° 27) que si nous augmentons la quantité et la concentration du chlorure mercurique (50 mg au lieu de 10 mg) dans 20 ml d'eau, la quantité de mercure fixé ne s'accroît que faiblement. Ainsi en milieu de culture additionné de jus de levure comme en resting-cells, la souche résistante est capable de fixer un maximum de mercure qui est du même ordre dans les deux cas.

Nous avons enfin réalisé la même expérience que celle consignée sur le tableau N° 30 mais avec un temps de contact de 24 heures, les quantités de mercure fixé n'ont été que très légèrement supérieures ; seules les cellules soumises aux essais n° 1 et n° 2 sont restées vivantes et capables de proliférer ultérieurement, ainsi, sans que la quantité de mercure fixé augmente notablement, la toxicité de cet élément s'accroît avec le temps.

Nos expériences (tableau N° 30) montrent donc que pour une même quantité de mercure placée dans le milieu de culture, la fixation du mercure par la cellule est du même ordre et ne dépend guère de la concentration, ni du temps de contact ; par contre la toxicité dépend de ces deux facteurs peut être parce qu'ils augmentent la pénétration du métal dans la cellule lui permettant ainsi d'atteindre des groupements -SH indispensables à la vie.



conclusion :

*Candida utilis* placée en resting-cells dans un milieu contenant chlorure mercurique est capable de fixer une partie du métal ; la quantité fixée augmente d'abord rapidement mais n'augmente plus guère après la 3<sup>e</sup> minute. Il y a moins de 1 mg de mercure dans 20 ml, la levure normale comme la levure résistante fixe la presque totalité du mercure offert ; pour des doses de mercure supérieures la levure résistante fixe 2 fois plus de mercure que la levure normale ; mais si le temps de contact entre le mercure et la levure est bref (fraction de minute), la levure résistante fixe 2 fois moins de mercure que la levure normale qui en fixe 1/3 de moins que si le contact est prolongé.

Lorsque les conditions sont telles que le maximum de mercure est fixé, la toxicité dépend du temps de contact et de la concentration de la solution de chlorure mercurique.

III) Respiration aérobie de *Candida utilis*, souche normale et souche résistante.

Nous avons étudié la consommation d'oxygène de nos deux souches de levure, placées dans des conditions physiologiques définies. La respiration traduit en effet un métabolisme fondamental de la vie bactérienne, et sa mesure donne une valeur numérique de l'activité biologique globale des cultures. Nous pouvions penser que la différence de résistance au chlorure mercurique des deux souches entraînait également une variation de la quantité d'oxygène consommé ; si une telle constatation avait pu être faite, elle aurait été en faveur du développement de la résistance au mercure à la suite de mutations.

L'influence du mercure à l'état de sel ou de vapeur, sur la respiration bactérienne, a déjà été étudiée. Les auteurs signalent une augmentation de la respiration (35) (43) ou de la fermentation (37) pour de très faibles doses du toxique ; mais rapidement, pour des concentrations supérieures, l'inhibition devient totale.

Le problème qui se pose à nous est différent : nous devons comparer la respiration de nos deux souches en absence de chlorure mercurique, afin



le pouvoir déterminer s'il existe une différence fondamentale dans leur fonction respiratoire ; et non pas étudier leur comportement respiratoire respectif en présence du toxique.

a) Principe.

Une culture bactérienne est mise en suspension dans un milieu non proliférant : soluté physiologique additionné de glucose (1%) ; l'absence de source azotée empêche la prolifération, mais la respiration s'effectue normalement au détriment du glucose. Cette suspension bactérienne est placée dans un volume clos, rempli d'air à la pression atmosphérique, le gaz carbonique produit par la respiration microbienne est absorbé par une solution de potasse ; la consommation d'oxygène est évaluée d'après la diminution de pression, mesurée avec un manomètre à eau.

b) Techniques utilisées.

1) Suspension bactérienne

Nous la préparons à partir de levures ensemencées sur milieu de culture additionné de jus de levure et prélevées en phase de croissance logarithmique. Les cellules sont séparées du milieu de culture par centrifugation, lavées avec une solution de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/15 (c'est à dire à 9,07 g par litre) et mises en suspension dans cette solution tampon.

2) Appareil de WARBURG

Nous utilisons l'appareil fabriqué par B. BRAUN à MELSUNGEN, modèle S.65.

3) Techniques opératoires

Les mesures manométriques sont effectuées selon la méthode de WARBURG aujourd'hui classique (57).(53). Nous ne donnerons donc que les précisions les plus importantes sur la technique de nos mesures.

Le volume du liquide introduit dans chaque fiole manométrique est de 3.3 ml :



2 ml d'une suspension de cellules dans une solution de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$

15 à pH 4.6

1 ml d'une solution de glucose à 3%, placée dans le diverticule latéral.

0.3 ml d'une solution de potasse à 40% placée dans le compartiment central dans lequel nous ajoutons un carré de papier filtre plié de 1 cm sur 1 cm pour faciliter l'absorption du gaz carbonique.

Les cellules introduites dans chaque fiole manométrique contiennent environ 1 mg de matière sèche. Les mesures sont effectuées à 30°. Les fioles et les manomètres sont jaugés par le constructeur à 1 l près, le volume total des fioles munies d'un diverticule latéral est de 14 à 17 ml. La durée des expériences manométriques est de 4 heures.

### c) Résultats

Cette méthode directe de WARBURG nous permet de déterminer : le taux d'oxygène consommé, par construction de la courbe donnant la consommation d'oxygène en fonction du temps. Chaque courbe est obtenue en faisant la moyenne de 3 fioles manométriques.

le coefficient respiratoire :  $Q_{O_2}$  est la quantité de  $\mu$  l d'oxygène consommé par mg de matière sèche de levure par heure.

Les résultats obtenus pour les deux souches de Candida utilisées normale et résistante sont identiques.

Les coefficients respiratoires  $Q_{O_2}$  ont été respectivement de :

Expérience N° 1 : 158 pour la souche normale

155 pour la souche résistante

Expérience N° 2 : 134 pour la souche normale

129 pour la souche résistante

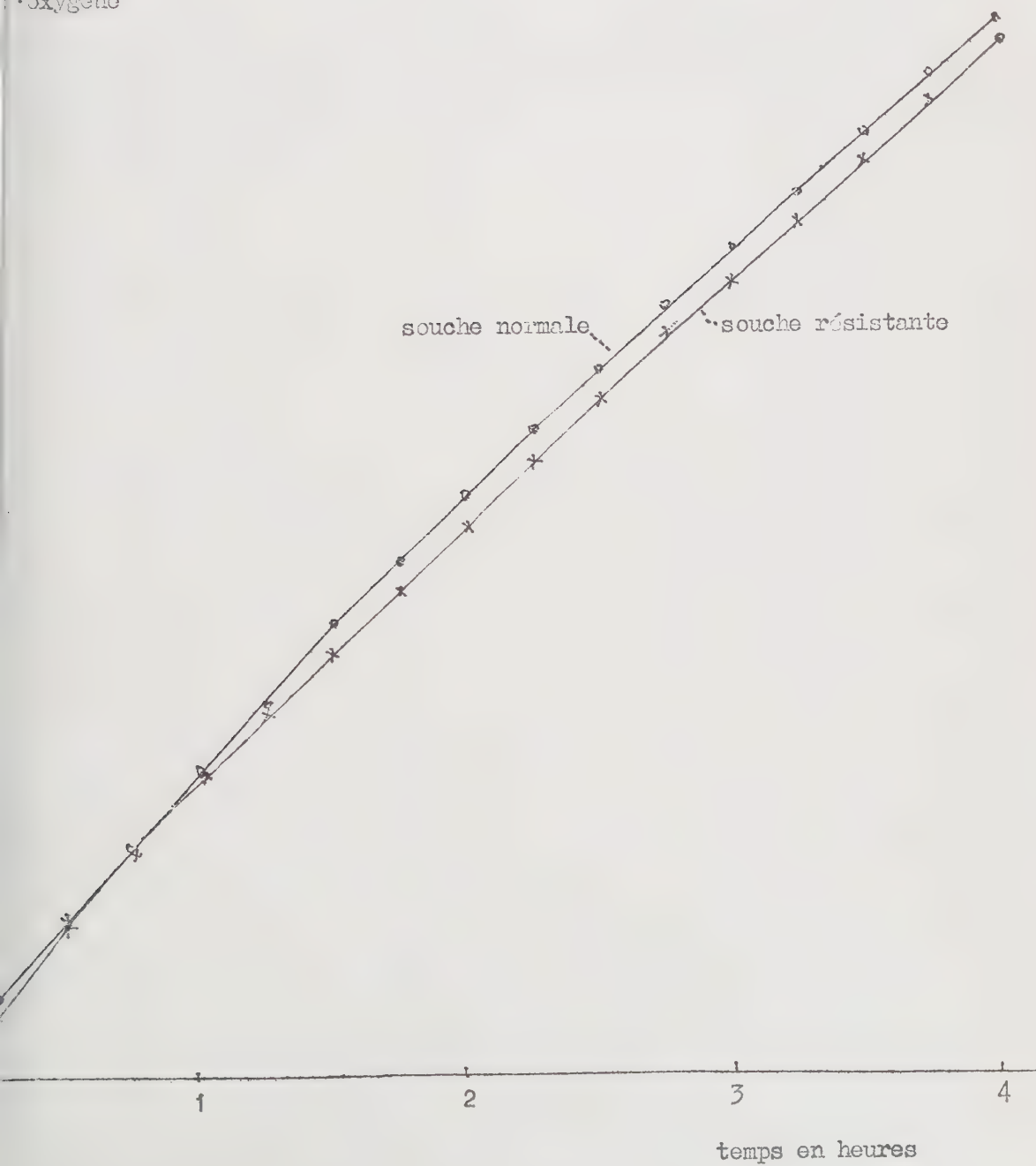
Le graphique N° 10 donne la consommation d'oxygène des deux souches pour l'expérience N° 1.



GRAPHIQUE N° 10

Formation d'oxygène de Candida utilis souche normale et souche résistante  
toxic-cells par mg de matière sèche.

oxygène





Les résultats sont analogues pour l'expérience N°2. La consommation d'oxygène est presque identique pour les deux souches, la légère différence observée n'étant certainement pas significative.

d) Conclusion

L'augmentation de résistance de Candida utilis au chlorure mercurique n'a pas modifié son processus respiratoire. En milieu non proliférant, exempt du toxique, la souche normale et la souche résistante ont la consommation d'oxygène identique.

\*

\*      \*



- CONCLUSIONS GENERALES -

-----

L'obtention d'une souche de *Candida utilis* résistante à l'ion mercurique et la recherche des caractères capables de rendre compte de cette résistance, tel a été l'objet du présent travail.

Dans le chapitre I, nous rappelons d'abord que l'apparition de la résistance a pu être attribuée avec beaucoup de vraisemblance à des phénomènes d'adaptation dans certains cas et de mutation dans d'autres. Puis nous analysons les opérations qui nous ont permis d'obtenir une souche de *Candida utilis* (Honneberg) Lodder, sept fois plus résistante à l'ion mercurique que ne l'est la souche mère : *Candida utilis* a été cultivée sur milieu additionné de levure en présence de quantités croissantes de chlorure mercurique, la résistance s'établit par paliers et après 35 repiquages n'augmente plus ; la levure supporte alors une concentration de 350  $\mu\text{g}$  de chlorure mercurique pour 100 ml de milieu synthétique et 750  $\mu\text{g}$  pour 100 ml de milieu additionné de jus de levure ; concentration qui n'a pas varié, soit par accroissement de la dose initiale du toxique, soit par addition de cystéine au milieu. La résistance est apparue par paliers, de sorte que nous ne pouvons décider s'il s'agit d'une succession de mutations de faible importance ou d'une adaptation résultant de la présence d'ion mercurique dans le milieu.

Nous avons observé que l'ion mercurique a totalement disparu du milieu lorsque la croissance est terminée ; ce qui nous a incité à étudier ces interactions se produisant entre le chlorure mercurique et la levure, souche normale et souche résistante, au cours de la phase de latence et pendant le développement. Ces recherches font l'objet du chapitre II.

Pour doser le mercure, nous avons employé la technique de ASAK et SEDIVEC, telle qu'elle est exposée par CHARLOT et BEZIER et qui, entre nos mains, a donné des résultats satisfaisants lorsque la prise d'essai contient de 5 à 25  $\mu\text{g}$  de mercure.



En fin de croissance, lorsque le développement de la levure normale ou de la levure résistante a lieu respectivement sur la concentration maximum en chlorure mercurique permettant une croissance normale, le pourcentage de mercure qui reste dans le milieu synthétique est toujours faible, lorsque le milieu de culture est additionné de jus de levure, il en reste une plus forte proportion ; enfin le mercure restant dans les milieux de culture ne varie pas de façon significative suivant que nous expérimentons avec la souche normale ou la souche résistante.

En milieu synthétique, la souche résistante fixe en moyenne 95% du mercure initial et la souche normale 67% ; en milieu additionné de jus de levure, le mercure fixé est respectivement de 65% avec la souche résistante et de 22% avec la souche normale. Ainsi la levure résistante fixe des pourcentages de mercure bien supérieurs à ceux fixés par la levure normale, la différence étant hautement significative.

Le total du mercure retrouvé dans le milieu et fixé par les levures est souvent très inférieur à la quantité initialement mise en jeu. Nous avons pu mettre en évidence la formation d'un composé mercuriel volatil, insoluble dans l'eau, imparfaitement arrêté par barbotage dans du sulfure de sodium, mais quantitativement fixé par l'hypobromite de sodium. Le pourcentage du mercure initial qui se transforme en composé volatil est d'autant plus fort, que le mercure reste plus longtemps à l'état ionisé dans le milieu de culture : c'est surtout le cas de la levure normale croissant en présence d'une concentration de chlorure mercurique telle que la phase de latence se prolonge pendant plusieurs jours.

Le broyage des levures, cultivées en présence de chlorure mercurique, nous a montré qu'une faible proportion du mercure est fixée par les membranes et que le toxique pénètre, en quantité importante, dans le suc cellulaire.

Pour que la levure puisse se développer en présence de chlorure mercurique, il semble nécessaire que l'ion mercurique ait en grande partie disparu du milieu, ce résultat s'obtient beaucoup plus rapidement avec la



souche résistante qu'avec la souche normale. L'étude cinétique de la disparition du mercure du milieu de culture nous a montré qu'il s'agit d'un processus actif qui se ralentit lorsque la concentration initiale du mercure augmente. La levure résistante se différencie de la levure normale par une fixation beaucoup plus rapide du toxique. Lorsque le mercure ionisé a presque totalement disparu du milieu, la division cellulaire commence, la croissance est alors aussi rapide et complète que celle d'une levure cultivée en l'absence du toxique.

Dans le chapitre III, nous donnons des arguments à l'appui d'une hypothèse que nous formulons, selon laquelle l'augmentation de la résistance au mercure de notre levure serait due à l'apparition de nouveaux groupements -SH. Nous dosons ces groupements dans l'acido-soluble par la méthode de FUJITA-NUMATA, modifiée par BRUCKMANN et WERTHEIMER et nous montrons que la teneur de la levure normale est de 2,2 mg de groupements -SH exprimés en cystéine par gramme de levure sèche contre 12,8 mg pour la levure résistante. Ces valeurs varient peu d'un essai à un autre et montrent que la levure résistante est environ 6 fois plus riche en groupements -SH que la levure normale.

Nous avons pensé que ce caractère donnerait à la levure une résistance accrue vis à vis d'autres ions capables de former des sulfures insolubles (résistance croisée), les essais que nous avons faits avec l'ion cadmique, l'ion aurique et l'arséniate n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse ; pourtant avec l'ion cuivrique la résistance est doublée.

La levure normale et la levure résistante placées en resting-cells fixent des quantités de mercure du même ordre, si la quantité offerte est faible ; en augmentant la dose, la levure normale fixe deux fois moins de mercure que la levure résistante.

Cependant si le temps de contact du mercure avec la levure est bref, (fraction de minute) les résultats sont inversés et la levure résistante fixe six fois moins de mercure que la levure normale ; ce qui fait penser que chez la souche résistante, les groupements -SH quoique plus nom-



reux, sont plus difficiles à atteindre par le métal. Lorsque les conditions sont telles que le maximum de mercure est fixé, la toxicité dépend du temps de contact et de la concentration du chlorure mercurique.

Enfin les expériences de consommation d'oxygène, mesurées avec l'appareil de WARBURG nous ont donné des résultats pratiquement identiques pour la levure normale et la levure résistante, ce qui ne s'inscrit pas en faveur de l'hypothèse du développement de la résistance au mercure par mutation (S).

\*

\*

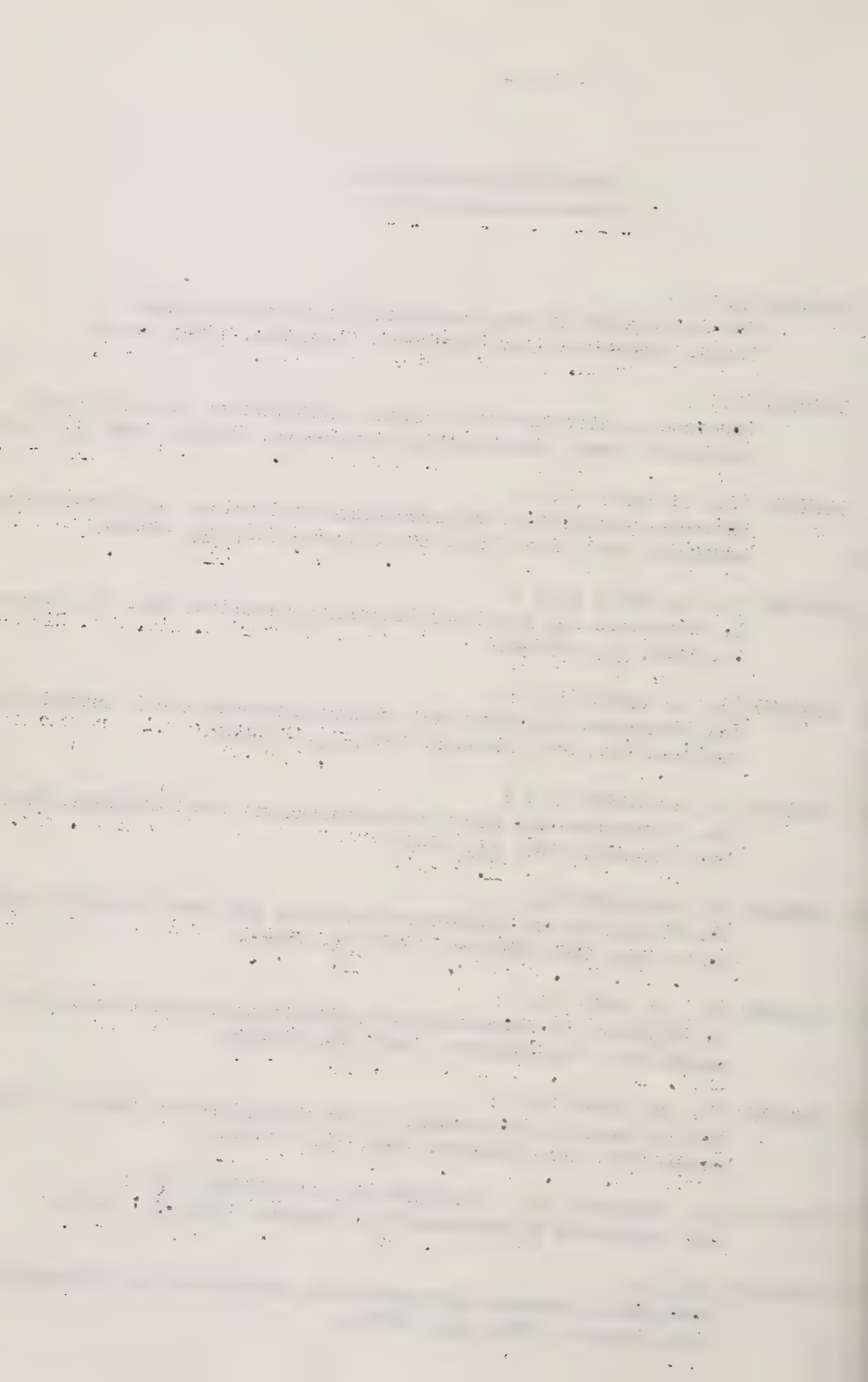
\*



- INDEX BIBLIOGRAPHIQUE -

-----

- ABRAHAM (E.P.) :  
The development of drug resistance in micro-organisms.  
Third. Symposium. gen. Microbiol. Cambridge. 1953, 201-34.
- BENIGNO (P.) :  
Ricerche quantitative sull'azione antibatterica di sulfamidici  
mercurati. Arch. internation. Pharmacodyn. Thérap. 1948, 77, 5-16.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
Ricerche quantitative sul meccanismo dell'azione antibatterica del  
mercurio. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1946, 22, 988-90.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
I. Fissazione nei germi del bichloruro mercurico. Ric. Sci. Ricostr.  
1946, 16, 1633-6.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
II. Fissazione nei germi del cianuro mercurico e del mercurio ne-  
tallico. Ric. Sci. Ricostr. 1946, 16, 1779-82.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
III. Fissazione nei germi del mercurocromo e del metaferene. Ric.  
Sci. Ricostr. 1947, 17, 29-31.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
IV. Fissazione del bichloruro mercurico nei germi divenuti resis-  
tenti. Ric. Sci. Ricostr. 1947, 17, 184-5.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
V. Influenza de cloruro sodico sulla fissazione del mercurico nei  
germi. Ric. Sci. Ricostr. 1947, 17, 869-72.
- BENIGNO (P.) et SANTI (R.) :  
VI. Influenza della cisteina sulla fissazione del mercurio nei  
germi. Ric. Sci. Ricostr. 1947, 17, 1117-21.
- BOIVIN (A.), DELAUNAY (A.), SARCIRON (R.) et LEHOULT (Y.) :  
Les autolysats bactériens. Rev. Immunol. 1942, 7, 124-33.
- BRIAULT (P.G.) :  
Cytoplasmic changes associated with adaptation and differentia-  
tion. Nature. 1956, 178, 1223-4.



- 1) BROWN (D.), KAYSER (F.) et SFIRAS (J.) :  
Dosage de petites quantités de mercure dans les liquides organiques et les tissus. Bull. Soc. Chim. Biol. 1930, 12, 504-9.
- 2) BRÜCKMANN (G.) WERTHEIMER (E.) :  
Alloxan studies : the action of alloxan homologues and related compounds. J. biol. Chem. 1947, 168, 241-56.
- 3) CAMBAR (R.) :  
Contribution à l'étude toxicologique du mercure. Recherches expérimentales sur l'intoxication par le cyanure de mercure et la dibromoxy-mercurifluorescéine disodique. Thèse Pharm. Bordeaux. 1940.
- 4) CAVALLITO (C.J.), BAILEY (J.H.), HASKELL (T.H.), Mc CORMICK (J.R.) et WARNER (W.F.) :  
The inactivation of antibacterial agents and their mechanism of action. J. Bacteriol. 1945, 50, 61-9.
- 5) CHARLOT (G.) et BEZIER (D.) :  
Analyse quantitative minérale. Masson et Cie. 3ème édit. Paris. 1955, 193-97 et 584-85.
- 6) CHINARD (F. P.) et HELLERMANN (L.) :  
Determination of sulphhydryl groups in certain biological substances. D'après GLICK (D.) in Methods of biochemical analysis. Interscience publish. Inc. New York. 1954, 1-26.
- 7) COHN (M.) et MONOD (J.) :  
Specific inhibition and induction of enzyme biosynthesis. Third Symposium. gen. Microbiol. Cambridge. 1953, 132-49.
- 8) CONWAY (E.J.) et BREEN (J.) :  
An "Ammonia" yeast and some of its properties. Biochem. J. 1945, 39, 368.
- 9) COOK (A.H.) :  
The chemistry and biology of yeasts. Academic. Press. Inc. New York. 1958.
- 10) COOK (E.S.), KREKE (C.W.), Mc DEVITT et BARLETT (M.D.) :  
The action of phenylmercuric nitrate. I. Effects on enzyme systems. J. biol. Chem. 1946, 162, 43-9.
- 11) COOK (E.S.), PERISUTTI (G.) et WALSH (T.M.) :  
The action of phenylmercuric nitrate. II. Sulphydryl antagonism of respiration depression caused by phenylmercuric nitrate. J. biol. Chem. 1946, 162, 51-4.



- 4) COOK (E.S.) et PERISUTTI (G.) :  
The action of phenylmercuric nitrate. III. Inability of sulfhydryl compounds to reverse the depression of cytochrome oxydase and yeast respiration caused by basic phenylmercuric nitrate. J. biol. Chem. 1957, 167, 827-32.
- 5) DEAN (A.C.R.) et HINSHELWOOD (S.C.) :  
Observations on bacterial adaptation. Third Symposium. gen Microbiol. Cambridge. 1953, 21-45.
- 6) DESCHARMES (M.) :  
Influence de l'irradiation ultra-violette sur la teneur en stérols des levures. Thèse Pharm. Nancy. 1955.
- 7) DIRHEIMER (G.) et EBEL (J.B.) :  
Sur la présence de métaphosphates cycliques dans la levure. Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 29, N° 2, 89-96.
- 8) DUVAL (C.) :  
Traité de micro-analyse minérale. Press. Scien. Intern. Paris. 1956.
- 9) FILDES (P.) :  
The mechanism of antibacterial action of mercury. Brit. J. experiment. Pathol. 1940, 21, 67-73.
- 10) FRIEDEBERG (H.) :  
Separation and determination of microgram quantities of silver, mercury and copper with dithizone. Anal. Chem. 1955, 27, 305-6.
- 11) FUJITA (A.) et NUMATA (I.) :  
Über die kolorimetrische Bestimmung des Glutathions. Biochem. Z. 1938, 300, 246-63.
- 12) FURNESS (G.) :  
Some factors affecting the destruction of Coli B. by shaking with glass beads. J. Gen. Microbiol. 1952, 7, 335-9.
- 13) GRUNERT (R.P.) et PHILLIPS (P.H.) :  
Sodium and its relation to alloxan diabetes and glutathione. J. biol. Chem. 1949, 181, 820-7.
- 14) HADOT (J.J.) :  
Modifications apportées à l'action antibiotique des sulfamides par leur association avec divers composés chimiques.  
Thèse Pharm. Nancy. 1951.

(18) (19) (20) (21) (22)

... ..  
... ..  
... ..

... ..  
... ..

... ..  
... ..

... ..  
... ..

... ..

... ..  
... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

- 9) HARIS (J.O.), EISENSTARK (A.) et DEAN (R.) :  
A study of the location of adsorbed mercuric ions in *E. coli*. J. Bact. 1954, 68, 745-8.
- 10) HORWITZ (L.) :  
Observations on the effect of metallic mercury upon some microorganisms. J. Cellular. Comp. Physiol. 1957, 49, 437-53.
- 11) HUGO (W.B.) :  
The preparation of cell-free enzymes from microorganisms. Bact. Rev. 1954, 18, 87-105.
- 12) IMSHENESKI (A.A.) et PEROVA (K.Z.) :  
Activité des levures dans leur adaptation aux antiseptiques (en Russe) Mikrobiologiya. 1954, 23, 53-6.
- 13) IMSHENESKI (A.A.) et PEROVA (K.Z.) :  
Adaptation des levures aux poisons (en Russe) Mikrobiologiya. 1955, 24, 147-50.
- 14) IMSHENESKI (A.A.) et PEROVA (K.Z.) :  
Caractères morphologiques et physiologiques de levures adaptées au phénol ou au sublimé (en Russe) Mikrobiologiya 1957, 26, 297-305.
- 15) JUDE (A.), NORDMANN (J.), GIRARD (P.), NORDMANN (R.), SERVANT (P.) et GAUCHERY (O.) :  
Action de certains inhibiteurs sur l'activité enzymatique bactérienne. III. Etude bactériologique des inhibiteurs mercuriels. Rev. Immunol. 1952, 16, 286-99.
- 16) KAYSER (F.) :  
Contribution à l'étude de la pharmacodynamie de quelques nouveaux composés mercuriels et de l'hydroxymercuripropanolamide de l'acide orthoacétyloxybenzoïque (Neptal).  
Thèse. Pharm. Paris. 1931.
- 17) LAMANNA (C.) et MALLETTE (M.F.) :  
Use of glass beads for the mechanical rupture of microorganisms in concentrated suspensions. J. Bact. 1954, 67, 503.
- 18) LAMBIN (S.), GERMAN (M.A.), CARRERE (C.) et BERNARD (J.) :  
Influence de diverses substances antiseptiques sur la respiration bactérienne. Ann. Pharm. Franç. 1957, 5, 273-288.
- 19) LAMOTTE (M.) :  
Introduction à la biologie quantitative. Masson et Cie, Paris. 1948.

Figure 1. The effect of the concentration of the *Agaricus bisporus* spores on the growth of *Agaricus bisporus* on the substrate.

- 1) MASSON (L.) :  
Essai sur l'adaptation des bactéries aux antiseptiques.  
Thèse Pharm. Paris. 1910.
- 2) MOREAU (R.) :  
Contribution à l'étude analytique du mercure. Thèse Pharm. Paris.  
1943.
- 3) NAIKI (N.), MINAGAWA (T.), ARAKATSU (Y.) et ASHIDA (J.) :  
Studies on the adaptation of yeast to copper. IX. Copper combining  
capacity of resistant cells. Mem. Coll. Science. Univ. Kyoto, Série  
B, 1954, 21, 87-97.
- 4) PASCAL (P.) :  
Traité de Chimie minérale. 1933. Masson et Cie, éditeurs. 941-94.
- 5) PIERFITTE (M.) :  
Teneur en acides nucléiques de Escherichia coli sulfamido résistant.  
Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1957, 34, 138-42.
- 6) PORTER (J.R.) :  
Bacterial chemistry and physiology. 1948. Chapman and Hall, Ltd  
London. J. Wiley and sons, Inc. N.Y.
- 7) POUCHOL (J.) :  
Effet de l'association d'un sulfamide et d'un phénol sur la crois-  
sance d'une bactérie (E. coli). Thèse Pharm. Nancy. 1950.
- 8) ROTHSTEIN (A.) :  
Enzyme systems of the cell surface involved in the uptake of sugars  
by yeast. Symposia of the society for experimental Biology. Cambrid-  
ge. 8, 1954.
- 9) SARTORY (A.), SARTORY (R.) et MEYER (J.) :  
Microbiologie pratique. Maloine. Paris. 1950. 637-47.
- 10) SELIBER (G.) et KATZNELSON  
Influence du sublimé sur la valeur osmotique de la cellule  
de levure. C.R. Soc. Biol. 1927, 97, 515-16.
- 11) SLONIMSKI (P.) :  
La formation des enzymes respiratoires chez la levure.  
Actual. biochim. 1953, 17, 17-19.
- 12) THOMAS (G.W.) et COOK (E.S.) :  
The action of phenylmercuric nitrate. IV. The ability of sulfhydryl  
compounds to protect against the germicidal action of basic phenyl-  
mercuric nitrate. J. Bact. 1947, 54, 527-33.

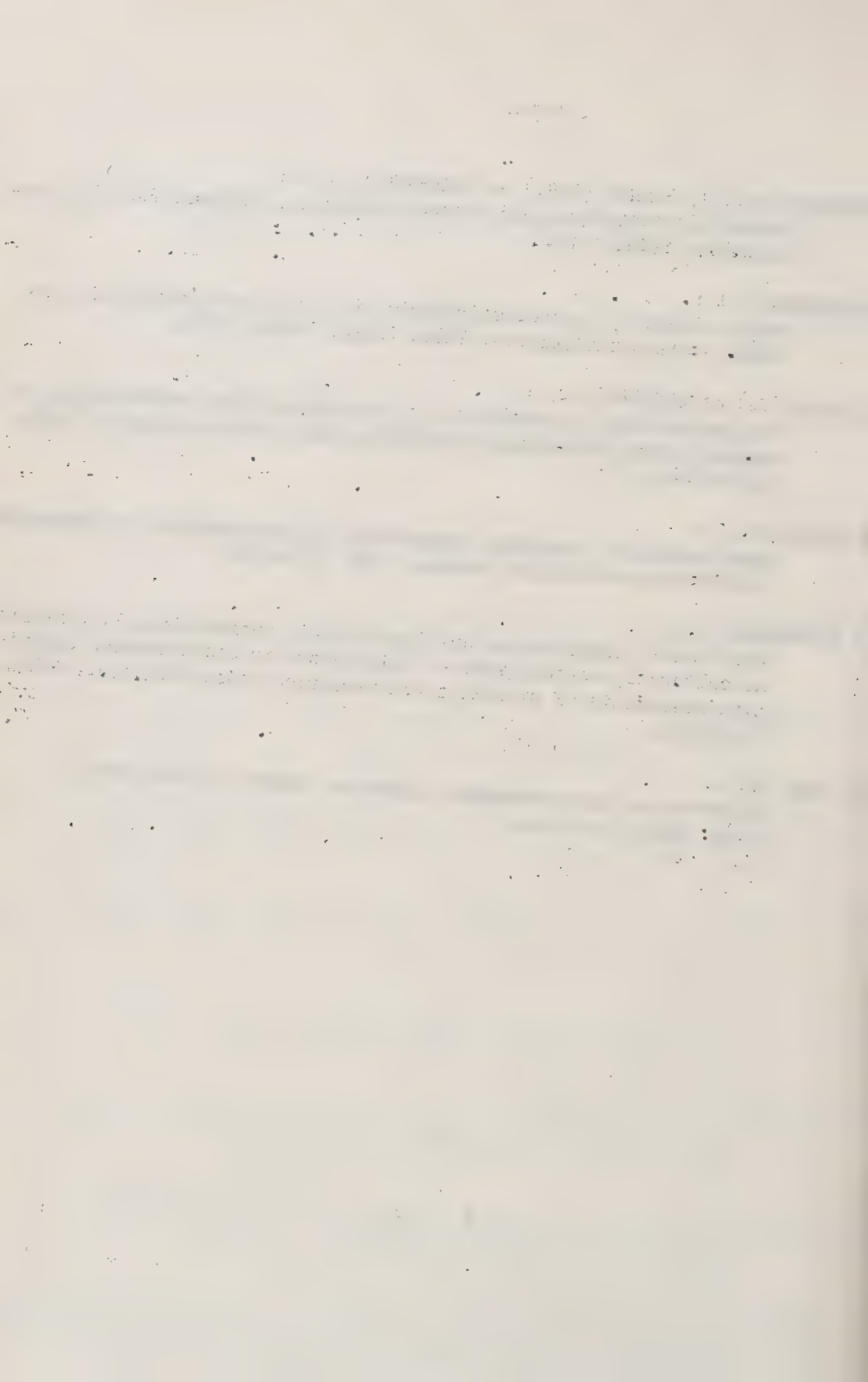


- 7) UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.) et STAUFFER (J.F.) :  
Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess. Publ Co, Minneapolis. 1949. 1-16.
- 8) VARENNE (F.) :  
Sur la lipémie, la cholestérolémie et la phospholipémie dans certains états pathologiques. Thèse Pharm. Nancy. 1957.
- 9) VASAK (V.) et SEDIVEC (V.) :  
The application of complexone in colorimetry. The determination of mercury using dithizone. Coll. Trav. Chim. Tchécoslovaquie. 1950, 15, 1076-84.
- 10) WELSCH (M.) :  
Some aspects of microbial resistance to streptomycin. Ier Symposium intern. Chim. microbiol. Genève. 1952, 173-183.
- 11) ZAMBONELLI (C.) :  
Studi sull' assuefazione dei lieviti agli antisettici. I. Variazioni culturali, morfologiche e fisiologiche in *Saccharomyces cerevisiae* resistente al nitrato fenil mercurico. Ann. Microbiol. 1957, 7, 183-91.
- 12) ZUNZ (E.) :  
Eléments de Pharmacodynamie spéciale. Masson et Cie. Paris. 1932, 952-5 et 974-5.

\*

\*

\*



# - TABLE DES MATIERES -

|                                                                                                                                        | Pages |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| PROPOS .....                                                                                                                           | 1     |
| INTRODUCTION .....                                                                                                                     | 2     |
| TITRE I : OBTENTION D'UNE SOUCHE DE CANDIDA UTILIS RE-<br>SISTANTE AU CHLORURE MERCURIQUE .....                                        | 4     |
| A) - NOTIONS GENERALES SUR L'ACQUISITION DE LA RESIS-<br>TANCE : ADAPTATION ET MUTATION .....                                          | 4     |
| B) - ISOLEMENT D'UNE SOUCHE RESISTANTE .....                                                                                           | 8     |
| I - Origine et identification de la souche de<br>levure employée .....                                                                 | 8     |
| II - Milieux de culture employés .....                                                                                                 | 9     |
| a) milieu additionné de jus de levure ...                                                                                              | 9     |
| b) milieu synthétique .....                                                                                                            | 10    |
| III - Solution de chlorure mercurique .....                                                                                            | 12    |
| IV - Conditions opératoires et mesure du dé-<br>veloppement bactérien .....                                                            | 12    |
| V - Techniques employées pour obtenir une<br>souche de Candida utilis résistante au<br>chlorure mercurique .....                       | 14    |
| VI - Tentatives pour augmenter la résistance<br>au chlorure mercurique de Candida utilis,<br>souche résistante .....                   | 23    |
| VII - Discussion et conclusion .....                                                                                                   | 25    |
| TITRE II : ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE LE CHLORURE MER-<br>CURIQUE ET CANDIDA UTILIS (SOUCHE NORMALE ET<br>SOUCHE RESISTANTE) ..... | 27    |
| A) - TECHNIQUES UTILISEES POUR LE DOSAGE DU MERCURE..                                                                                  | 27    |
| I - Méthode employée dans nos recherches : do-<br>sage proprement dit .....                                                            | 28    |
| II - Mode opératoire .....                                                                                                             | 31    |
| a) Minéralisation .....                                                                                                                | 31    |
| b) Dosage de l'ion mercurique .....                                                                                                    | 32    |
| 1 - Réactifs .....                                                                                                                     | 32    |
| 2 - Technique utilisée .....                                                                                                           | 33    |
| III - Justification de la méthode employée dans<br>nos dosages .....                                                                   | 37    |

# THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE  
THE HISTORY OF THE

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| B) - ETUDE DE LA REPARTITION DU MERCURE ENTRE LES LEVURES ET LE MILIEU DE CULTURE EN FIN DE CROISSANCE. PENE-<br>TRATION DU MERCURE A L'INTERIEUR DES CELLULES ..... | 39 |
| I - Techniques utilisées .....                                                                                                                                       | 39 |
| II- Teneurs comparatives en mercure du milieu de cul-<br>ture et des levures .....                                                                                   | 39 |
| a) Croissance sur milieu additionné de jus de<br>levure .....                                                                                                        | 39 |
| b) Croissance sur milieu synthétique .....                                                                                                                           | 42 |
| c) Analyse statistique des résultats .....                                                                                                                           | 44 |
| d) Conclusion .....                                                                                                                                                  | 47 |
| III - Pénétration du mercure à l'intérieur des cel-<br>lules .....                                                                                                   | 48 |
| a) Techniques utilisées .....                                                                                                                                        | 49 |
| b) Marche d'un essai .....                                                                                                                                           | 50 |
| c) Discussion .....                                                                                                                                                  | 52 |
| d) Conclusion .....                                                                                                                                                  | 52 |
| C) - ETUDE CINETIQUE DE L'IONISATION DU MERCURE DANS LE<br>MILIEU ET DE SA FIXATION PAR LES LEVURES AU COURS<br>DE LEUR DEVELOPPEMENT .....                          | 53 |
| I - Ionisation du mercure et croissance de la le-<br>vure sur milieu additionné de jus de levure...                                                                  | 53 |
| a) Techniques utilisées .....                                                                                                                                        | 53 |
| b) Résultats obtenus avec :                                                                                                                                          |    |
| 1 - La levure normale .....                                                                                                                                          | 54 |
| 2 - La levure résistante.....                                                                                                                                        | 56 |
| c) Conclusion .....                                                                                                                                                  | 58 |
| II - Fixation du mercure par la levure au cours de<br>son développement sur milieu additionné de jus<br>de levure .....                                              | 58 |
| 1 - Levure normale .....                                                                                                                                             | 60 |
| 2 - levure résistante .....                                                                                                                                          | 62 |
| 3 - Levure résistante ensemencée sur une<br>plus forte concentration de chlorure<br>mercurique .....                                                                 | 65 |
| Conclusion de l'étude cinétique .....                                                                                                                                | 67 |
| D) - FORMATION D'UN COMPOSE MERCURIEL VOLATIL .....                                                                                                                  | 68 |
| I - Mise en évidence du phénomène .....                                                                                                                              | 70 |
| II - Conditions de formation du composé volatil ...                                                                                                                  | 73 |
| III - Volatilité du mercure à partir de solutions de<br>chlorure mercurique et de cystéine .....                                                                     | 75 |

4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It suggests that the results have significant implications for the field of research and may lead to further developments in the future.

5. The fifth part of the document concludes the study. It summarizes the key findings and provides a final statement on the importance of the research.

6. The sixth part of the document includes a list of references and a list of figures. The references cite the various sources used in the study, and the figures provide a visual representation of the data.

7. The seventh part of the document includes a list of appendices. These appendices provide additional information and data that are not included in the main body of the document.

8. The eighth part of the document includes a list of footnotes. These footnotes provide additional information and clarification on the various points made in the document.

9. The ninth part of the document includes a list of acknowledgments. These acknowledgments thank the various individuals and organizations that have supported the study.

10. The tenth part of the document includes a list of contact information. This information provides a way for others to reach out to the author for more information or to discuss the study further.

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <u>TITRE III</u> : LA RESISTANCE AU CHLORURE MERCURIQUE DE LA SOUCHE ISOLEE PARAIT ATTRIBUABLE A SA PLUS FORTE TENEUR EN GROUPEMENTS -SH. .... | 79  |
| A) - INHIBITION DE L'ACTION TOXIQUE DE L'ION MERCURIQUE PAR LA CYSTEINE .....                                                                  | 79  |
| B) - DOSAGE DES GROUPEMENTS -SH CHEZ CANDIDA UTILIS (SOUCHE NORMALE ET SOUCHE RESISTANTE) .....                                                | 81  |
| I - Méthode utilisée .....                                                                                                                     | 82  |
| II - Extraction des groupements -SH de la levure .....                                                                                         | 85  |
| III - Dosage des groupements -SH .....                                                                                                         | 85  |
| IV - Résultats .....                                                                                                                           | 86  |
| C) - LA TENEUR PLUS ELEVEE EN GROUPEMENTS -SH DE LA LEVURE RESISTANTE LUI COMMUNIQUE-T-ELLE D'AUTRES PROPRIETES ? .....                        | 90  |
| I - Résistance vis à vis d'autres métaux .....                                                                                                 | 90  |
| a) Techniques utilisées .....                                                                                                                  | 91  |
| b) Résultats .....                                                                                                                             | 91  |
| 1 - résistance à l'ion cuivrique .....                                                                                                         | 91  |
| 2 - résistance à l'ion aurique .....                                                                                                           | 92  |
| 3 - résistance à l'ion cadmique .....                                                                                                          | 93  |
| 4 - résistance à l'arséniate .....                                                                                                             | 94  |
| c) Conclusion .....                                                                                                                            | 94  |
| II - Fixation du chlorure mercurique par Candida utilis en resting cells .....                                                                 | 94  |
| a) Etude quantitative du mercure fixé .....                                                                                                    | 95  |
| 1 - Techniques utilisées .....                                                                                                                 | 95  |
| 2 - Résultats .....                                                                                                                            | 96  |
| b) Fixation du mercure en fonction du temps de contact .....                                                                                   | 98  |
| c) Survie des levures après fixation de mercure en resting cells .....                                                                         | 100 |
| III - Respiration aérobie de Candida utilis (souche normale et souche résistante) .....                                                        | 103 |
| a) Principe .....                                                                                                                              | 104 |
| b) Techniques utilisées .....                                                                                                                  | 104 |
| c) Résultats .....                                                                                                                             | 105 |
| d) Conclusion .....                                                                                                                            | 107 |
| CONCLUSIONS GENERALES .....                                                                                                                    | 108 |
| EX BIBLIOGRAPHIQUE .....                                                                                                                       | 112 |



UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

oOo

T H E S E

présentée par Monsieur GERARDIN Claude, François

Né le 7 mars 1933 à FOUG (Meurthe et Moselle).

Nationalité Française

et portant le titre :

Sur la résistance au mercure d'une levure  
(Candida utilis).

Obtention d'une souche résistante. Ses caractères

Vu,

NANCY, le 28 Novembre 1958

Le Président de thèse,

F. KAYSER

Vu et approuvé

NANCY, le 28 Novembre 1958

Le Doyen de la Faculté,

F. KAYSER

Vu et Permis d'imprimer

NANCY, le 29 Novembre 1958

Le Recteur de l'Académie,

Président du Conseil de l'Université,

G. HAYER





